

定量的プロテオミクスとヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いた薬物の消化管吸収特性の定量的予測

著者	赤澤 貴憲
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301乙第9384号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00125897

定量的プロテオミクスとヒト **iPS** 細胞由来小腸上皮
細胞を用いた薬物の消化管吸収特性の定量的予測

赤澤 貴憲

本学位論文は、下記の原著論文をもとに作成され、東北大学大学院 薬学研究科に提出されたものである。

1. Takanori Akazawa, Yasuo Uchida, Masanori Tachikawa, Sumio Ohtsuki, Tetsuya Terasaki. Quantitative targeted absolute proteomics of transporters and pharmacoproteomics-based reconstruction of P-glycoprotein function in mouse small intestine. Molecular pharmaceutics, 2016, 13: 2443-2456.
2. Takanori Akazawa, Yasuo Uchida, Eisuke Miyauchi, Masanori Tachikawa, Sumio Ohtsuki, Tetsuya Terasaki. High Expression of UGT1A1/1A6 in Monkey Small Intestine: Comparison of Protein Expression Levels of Cytochromes P450, UDP-Glucuronosyltransferases, and Transporters in Small Intestine of Cynomolgus Monkey and Human. Molecular pharmaceutics, 2018, 15: 127-140.
3. Takanori Akazawa, Shinpei Yoshida, Shuichi Ohnishi, Takushi Kanazu, Makoto Kawai, and Koji Takahashi. Application of Intestinal Epithelial Cells Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells for Studies of Prodrug Hydrolysis and Drug Absorption in the Small Intestine. Drug Metabolism and Disposition, 2018, 46:1497–1506

第1章 諸言

第1節 新薬開発におけるヒト消化管吸収予測の重要性及び課題

1997年から2008年までの外資系大手製薬企業13社の統計によれば、ヒト第一相臨床試験に進んだ医薬品候補化合物が第二相臨床試験に進む確率は54%と報告されている (Paul et al., 2010). 第一相臨床試験は、前臨床試験で選抜された化合物がヒトにおいて体内動態及び安全性の点で問題がないことを確認するための試験であることから、約半数の候補化合物は前臨床試験で実施する動物実験や *in vitro* 試験系からでは、ヒト動態もしくは安全性を十分に予測できていないことを示唆している. 特に体内動態は、薬効及び副作用発現にも起因することから、ヒト体内動態を非臨床試験でいかに確度高く予測できるかが医薬品開発成功確率向上の重要な鍵となり得る.

経口投与は、最も汎用される投与経路であり、2014年の処方数世界トップ200の医薬品うち、166化合物が経口薬であることが報告されている (Fuentes et al., 2018). 経口投与された薬物は、消化管管腔内から小腸上皮細胞を介して門脈中に吸収されるが、小腸上皮細胞には次節で述べるようなトランスポーター及び代謝酵素が発現し、基質薬の吸収性に影響を与える. 製薬企業では、前臨床試験において、マウス、ラット、イヌ及びサル等の実験動物を用いて医薬品候補化合物の小腸吸収性評価が行われるが、トランスポーター及び代謝酵素の基質薬は、実験動物とヒト間で小腸吸収性に種差を示す場合がある (Cao et al., 2006; Takahashi et al., 2009; Jones et al., 2016). 従って、実験動物を用いたヒト小腸吸収性予測には限界があり、種差の影響を回避したヒト *in vitro* 試験系からの予測が重要であるという認識が近年高まってきている.

第2節 薬物の小腸吸収に影響するトランスポーター及び代謝酵素

薬物吸収に影響を与えるトランスポーターのほとんどは、管腔側の微絨毛構造を有する頂端膜と血管側の基底側膜のいずれかの細胞膜に局在する (Figure 1-1). また、薬物代謝に関わる代表的な代謝酵素として、cytochrome P450 (CYP), UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 及び carboxylesterase (CES) が挙げられるが、CYP 及び UGT はミクロソーム膜に、CES はミクロソーム膜及び細胞質に発現する. これまで多くの研究者によって、小腸に発現するトランスポーター及び代謝酵素について、RT-PCR, ウェスタンブロッティング及び免疫染色等の手法を用いた発現解析や遺伝子ノックアウトマウスや阻害剤を用いた機能解析が行われ、医薬品の吸収に重要なトランスポーター及び代謝酵素について理解が進んできた. そこで本節では、医薬品の小腸吸収に影響を与える主要な小腸トランスポーター及び代謝酵素に関する知見を整理した.

ABC トランスポーター

ATP binding cassette (ABC) トランスポーターは、ATP の加水分解エネルギーを駆動力として輸送基質を細胞外に排出する 1 次性能動輸送型のトランスポーターである. ABC トランスポーターのうち、小腸上皮細胞の頂端膜に発現する P-glycoprotein (P-gp; 別名, ヒト及びサルでは MDR1, げっ歯類では *mdr1a* または *mdr1b*) 及び breast cancer resistant protein (BCRP; 別名 ABCG2) が、これまでのヒト臨床知見から経口薬の小腸吸収で重要なトランスポーターとして位置づけられている (Giacomini et al., 2010). そのため、新薬開発では、候補化合物がこれらのトランスポーターの基質及び阻害剤となるかを調べなければならないことが日米欧の薬物相互作用評価に関するガイダンス及びガイドラインにおいて明文化されている.

ABC トランスポーターのうち、P-gp は多種多様な薬物の小腸吸収性に影響を

与えるため、医薬品開発において最も重要なトランスポーターと認識されている。薬物の消化管吸収に対する P-gp の影響は、げっ歯類では遺伝子ノックアウトマウスを用いて解析されており、Adachi らは、mdr1a/1b (-/-) マウス及び野生型マウスに対して in situ 小腸灌流試験を行った結果、種々の P-gp 基質薬では mdr1a/1b (-/-) マウスで野生型マウスよりも小腸吸収性が高まったことから、マウス小腸に発現する P-gp は、基質薬の吸収を制限することが示されている (Adachi et al., 2003)。また、ヒトにおいても fexofenadine, aliskiren 及び dabigatran のような P-gp 基質薬は、P-gp 阻害剤との併用投与により血漿中濃度が高まったことから、ヒトにおいても P-gp が基質薬の小腸吸収を制限することが示唆されている (Simpson and Jarvis, 2000; Tapaninen et al., 2011; Delavenne et al., 2012)。

P-gp に加えて BCRP も薬物の小腸吸収に重要な排出トランスポーターである。P-gp と BCRP は基質認識性が一部の薬物で重複することが知られているが、BCRP では P-gp とは異なり硫酸抱合体やグルクロン酸抱合体のような水溶性有機アニオン化合物についても基質とするのが特徴である (Giacomini et al., 2010)。BCRP 基質薬の sulfasalazine, topotecan 及び rosuvastatin は、経口投与後の血中濃度-時間曲線下面積 (area under the plasma concentration-time curve; AUC) が野生型マウスに比べて bcrp (-/-) マウスで上昇することから、マウスではこれらの基質の小腸吸収を BCRP の排出が制限することが示されている (Jonker et al., 2002; Zaher et al., 2006; Karibe et al., 2015)。また、ヒトにおいても BCRP 基質薬の sulfasalazine, atorvastatin 及び rosuvastatin は、BCRP 阻害剤の併用時や BCRP 遺伝子多型によって血漿中濃度の変動が観察されることから、ヒト小腸でも BCRP が基質薬の排出輸送に関与することが示唆されている (Keskitalo et al., 2009; Kusuhara et al., 2012)。

P-gp 及び BCRP 以外の ABC トランスポーターとして、multidrug resistance protein (MRP) 分子種もグルクロン酸抱合体やグルタチオン抱合体等、比較的水

溶性の高い化合物の輸送に関与する (Zhou et al., 2008). 小腸もしくは Caco-2 細胞では, 頂端膜に MRP2, 基底側膜に MRP1, 3, 4 及び 5 が発現する (Estudante et al., 2013). 小腸吸収に対する影響については, 遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析により, lopinavir の吸収には MRP2, methotrexate の吸収には MRP3, cefadroxil の吸収には MRP3 と MRP4 の両者が関与することが示されている (Kitamura et al., 2008; van Waterschoot et al., 2010; de Waart et al., 2012). しかしヒトにおいては, MRP 分子種が薬物の小腸吸収に関与するという臨床知見はまだ報告されていない.

SLC トランスポーター

Solute carrier (SLC) トランスポーターは, ナトリウムイオンやプロトンなどのイオン濃度勾配を駆動力として化合物を輸送する 2 次性能動輸送型, もしくは基質の濃度勾配を利用して輸送する促進拡散型のトランスポーターに大別される. 小腸では, グルコース, アミノ酸, ペプチド等の生命活動維持に必須の栄養物質の吸収が行われているが, これらの物質は水溶性が高く, 受動拡散では膜を透過しにくいいため, SLC トランスポーターがこれらの小腸吸収に重要な役割を担っている. 例えば, グルコースは頂端膜の sodium glucose cotransporter 1 (SGLT1) 及び基底側膜の glucose transporter 2 (GLUT2) (Drozdowski and Thomson, 2006; Roder et al., 2014) 等のグルコーストランスポーター, フルクトースは頂端膜の glucose transporter 5 (GLUT5) 及び基底側膜の GLUT2 (Drozdowski and Thomson, 2006), 乳酸や酪酸のような短鎖脂肪酸は頂端膜及び基底側膜に発現する monocarboxylate transporter 1 (MCT1) (Tamai et al., 1999; Gill et al., 2005), 中性アミノ酸は基底側膜の L-type amino acid transporter 2 (LAT2) / 4F2 heavy Cchain (4F2hc) 複合体 (Rossier et al., 1999), オリゴペプチドは頂端膜の peptide transporter 1 (PEPT1) (Ogihara et al., 1996; Rubio-Aliaga and Daniel, 2008), 葉酸は頂端膜の

proton-coupled folate transporter (PCFT) (Shayeghi et al., 2005; Laftah et al., 2009), タウリンは頂端膜の taurine transporter (TAUT) (Anderson et al., 2009), 胆汁酸は頂端膜の apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) (Craddock et al., 1998) 及び基底側膜の organic solute transporter α/β (OST α /OST β) 2 量体 (Ballatori et al., 2005) によってそれぞれ輸送される. これらの取り込みトランスポーターの中には, 栄養物質の吸収だけではなく, 基質とする栄養物と類似した構造をもつ薬物の輸送にも関与することが報告されている. PEPT1 は, セフェム系抗生物質, 抗ウイルス薬の valacyclovir 及び ACE 阻害剤の enalapril 等のペプチド様構造を有する薬物を基質として認識し, 小腸吸収を促進させる役割を担っている (Rubio-Aliaga and Daniel, 2008). また, 小腸における寄与は不明であるが, OST α /OST β の 2 量体は, digoxin を基質とすることが報告されている (Seward et al., 2003). さらに, これらの栄養物質の取り込みトランスポーターに加えて, 小腸には organic anion transporting polypeptide (OATP) 分子種が発現し, 有機アニオン系薬物の吸収に関与している. 例えば, ヒトにおいて, fexofenadine 及び talinolol のような OATP 基質薬の消化管吸収が, OATP 阻害作用を有するグレープフルーツジュース飲用時に減少し, さらに小腸に発現する OATP 分子の 1 つである OATP2B1 の遺伝子多型によって血漿中濃度が減少したことから, これらの薬物のヒト小腸吸収において OATP の関与が示唆されている (Tamai, 2012).

CYP

CYP は, 肝臓に豊富に存在する代謝酵素であるが, 小腸にも発現し, 経口薬の小腸代謝に対して重要な役割を担っている. 小腸に発現する CYP 分子種の中で最も発現割合が大きい分子種は CYP3A4 であり, 小腸に発現する全 CYP 分子種の 8 割以上を占めると報告されている (Paine et al., 2006; Groer et al., 2014; Miyauchi et al., 2016). Paine らは, CYP3A4 基質薬の midazolam を十二指腸内投

与した際に、門脈中にその代謝物が検出されたことから、小腸に発現する CYP3A4 が midazolam の代謝に寄与することが示唆されている (Paine et al., 1996). また、CYP3A4 は、種々のメカニズムによって代謝機能が阻害されることが知られており、その阻害様式は、1) amiodarone のような CYP3A4 基質薬との併用で見られるような基質結合部位を競合することによる競合阻害、2) ketoconazole との併用で見られるような CYP 活性中心に存在するヘム鉄に配位することによる非特異的阻害、3) erythromycin との併用で見られるような反応性代謝物が CYP と複合体を形成することによって CYP を不活性化する不可逆的阻害 (mechanism based inhibition; MBI) に大別される。1) 及び 2) の阻害様式は可逆的であるため、薬物の消失とともに阻害作用も消失するが、3) の阻害様式は、複合体を形成した CYP 分子が分解されて新たな CYP 分子が生成するまで阻害が持続するため、特に重篤な相互作用を生じる。Rashid らは、CYP3A4 との MBI を引き起こすグレープフルーツジュースを飲用した場合、経口投与した nifedipine の血漿中濃度は上昇するが、静脈投与した時には非飲用時と変わらないことから、nifedipine の小腸吸収に対して CYP3A4 を介した代謝が影響することが示唆されている (Rashid et al., 1995).

UGT

UGT は、カルボキシル基、水酸基及びアミンを有する薬物のグルクロン酸抱合代謝に関与する代謝酵素である。UGT 分子種は、UGT1 と UGT2 の 2 つのファミリーに分類され、さらにそれぞれ 1A と 1B 及び 2A と 2B の 2 つのサブファミリーが存在する。UGT が発現及び機能する代表的な臓器は肝臓であるが、ezetimibe はラットでは投与した薬物の 95%以上が小腸内でグルクロン酸抱合を受けることが報告されているように (van Heek et al., 2000)、薬物によっては小腸に発現する UGT が基質薬の体内動態に重要な影響を与える場合もある。ヒト小

腸上皮細胞には、8つのUGT1A分子種 (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9 及び 1A10) と 4つのUGT2B分子種 (UGT2B4, 2B7, 2B15 及び 2B17) と、多種多様な分子種が発現することが報告されている (Strassburg et al., 2000; Harbourt et al., 2012; Groer et al., 2014; Miyauchi et al., 2016). 各UGT分子種の基質認識性は広く、例えばezetimibeは、UGT1A1, 1A3 及び 2B15の基質、acetaminophenは、UGT1A1, 1A6, 1A9, 2B7 及び 2B15の基質、morphineは、UGT1A3, 1A10, 2B4 及び 2B7の基質であるように、1つの薬物のグルクロン酸抱合反応に対して複数のUGT分子種が関与すること特徴である (Ritter, 2007). 小腸ではUGTを解した抱合代謝に種差があることが報告されているが、この広範な基質特異性のため、基質薬の消化管吸収性の違いからではどのUGT分子種が種差に寄与するかを特定することは難しい (Furukawa et al., 2014).

CES

プロドラッグは、bioavailability (BA) を高めるための創薬手法の1つである。小腸吸収性が低い薬理活性化合物に対して、脂溶性を増加させる官能基や小腸の取り込みトランスポーターの基質となるような官能基をエステル結合やアミド結合で結合させることで、小腸吸収性の向上が期待できる。例えば、抗インフルエンザ薬のoseltamivirは活性体GS 4071のエステル型プロドラッグであるが、活性体のラットBAは5%以下であるのに対し、PEPT1の基質となるようにプロドラッグ修飾したoseltamivirのラットBAは、35%に高まることが報告されている (Li et al., 1998; Ogihara et al., 2009).

小腸膜透過後のプロドラッグは、生体内の加水分解酵素を介して活性体へと変換され、薬効を発揮する。プロドラッグ創薬において最も重要な加水分解酵素はCESであり、エステル結合、アミド結合及びチオエステル結合をもつ化合物の加水分解に関与する。ヒトには5種類のCES分子種 (CES1, 2, 3, 4 及び 5)

が存在するが，その中で医薬品の加水分解に関与する主な分子種は，CES1 及び CES2 の 2 種類である．CES1 と CES2 は組織局在が異なり，肝臓では CES2 よりも CES1 の方が高発現するのに対し，小腸では CES1 よりも CES2 が高発現する (Hosokawa, 2008)．また，組織局在の他に CES1 と CES2 では基質認識性も異なる．エステル型プロドラッグは，アシル側鎖とアルコール側鎖の結合で構成されるが，CES1 は oseltamivir, methylphenidate 及び temocapril のようなアルコール側鎖に比べてアシル側鎖が大きい化合物を基質とし，CES2 は 4-methylumbelliferyl acetate 及び irinotecan のようなアルコール側鎖に比べてアシル側鎖が小さい化合物を基質とするのが特徴である (Hosokawa, 2008)．

第 3 節 定量的プロテオミクスを用いた小腸トランスポーター及び代謝酵素の タンパク質発現量の種差の解明の必要性

消化管吸収性は、経口投与された薬物の小腸吸収率 (Fa) と小腸代謝を回避した割合 (Fg) の積 ($Fa \times Fg$) で表される。Takahashi らは、サル及びヒトにおける種々薬物の $Fa \times Fg$ 値を比較した結果、受動拡散吸収される薬物では両者の値が一致するのに対し、トランスポーター、CYP 及び UGT の基質薬の場合はヒトに比べてサルで $Fa \times Fg$ 値が低くなる傾向であることを報告している (Takahashi et al., 2009)。また、Cao らは、受動拡散で小腸上皮細胞を透過する薬物ではラットとヒトの小腸透過性は相関するが、verapamil のような P-gp 及び CYP3A4 の基質薬ではそれらの相関性から外れることを示している (Cao et al., 2006)。このように、トランスポーター及び代謝酵素の基質薬では、受動拡散を介して小腸吸収される薬物と比較して、実験動物とヒト間で消化管吸収性に種差が存在することが示唆されてきた。しかし、トランスポーター及び代謝酵素の基質認識性は広く、1 つの薬物に対して複数のトランスポーター及び代謝酵素の基質となる場合もある (Zhang and Benet, 2001; Court, 2005; Ritter, 2007; Kodaira et al., 2011; Poirier et al., 2014)。従って、基質薬の消化管吸収性に種差が認められても、その吸収性の違いからでは、どのトランスポーターまたは代謝酵素が種差に影響するかを特定することは難しい。

この課題を解決するためには、LC-MS/MS を用いた膜タンパク質絶対定量法が有効であると考えられる (Kamiie et al., 2008)。本手法は、標的タンパク質に特異的な配列ペプチドを定量プローブとして LC-MS/MS で測定することによって、複数の標的分子のタンパク質発現量を同時に測定できることが特徴である (Kamiie et al., 2008)。げっ歯類、サル及びヒト小腸に発現するトランスポーター及び代謝酵素については、これまで定量 PCR 法による遺伝子発現量の網羅的解析が報告されてきた (Nishimura et al., 2003; Nishimura and Naito, 2005; Bleasby et

al., 2006; Nishimura and Naito, 2006; Kim et al., 2007; Nishimura et al., 2009). しかし、ヒト小腸及び肝臓において、トランスポーター及び代謝酵素の活性は、遺伝子発現量よりもタンパク質発現量と相関することが報告されていることから (Sy et al., 2002; Berggren et al., 2007; Ohtsuki et al., 2012), 小腸におけるトランスポーター及び代謝酵素について実験動物とヒト間の機能的種差を考察する上で、それらのタンパク質発現量の違いを調べることを有用であると考えられる.

第 4 節 P-gp 輸送活性の再構築及びヒト iPS 由来小腸上皮細胞を用いた in vitro

試験からの小腸吸収予測

小腸吸収性は、1) 化合物の物性に従う受動拡散、2) 小腸トランスポーターを介した能動的輸送、3) 小腸代謝酵素による代謝の 3 つの機序の複合的関与によって決定される。小腸吸収性に対するトランスポーター及び代謝酵素の機能を in vitro 試験から再構築できれば、併用薬との薬物間相互作用 (drug-drug interaction; DDI) によってそれらの機能が阻害された場合に小腸吸収性がどの程度変動するかを予測できると期待される。また、小腸吸収性を非臨床試験の段階で in vitro 試験で予測できれば、ヒト吸収性が良好でない化合物を早期に避けることができ、新薬開発の成功確率向上に繋がると期待される。

以下では、上述の 2 つの課題解決に期待される方法として、新薬研究で最も重要なトランスポーターである P-gp について小腸吸収に対する影響を in vitro 試験系から再構築する方法及びヒト iPS 由来小腸上皮細胞を用いた小腸吸収性予測する方法について述べる。

小腸における P-gp の輸送活性の再構築

小腸における P-gp の輸送活性が併用薬との DDI によって阻害された場合、一部の基質薬では小腸吸収量が増大することが報告されている (Simpson and Jarvis, 2000; Tapaninen et al., 2011; Delavenne et al., 2012)。小腸吸収量の増加に伴い、血漿中濃度が上昇し、それによって副作用発現の懸念が高まることから、新薬開発では候補化合物の小腸吸収に対する P-gp の影響を定量的に調べる必要がある。しかし、小腸における P-gp の輸送活性には種差が存在し (Takahashi et al., 2009; Cao et al., 2006)、ヒトの体内動態に対する小腸 P-gp の影響を実験動物を用いて予測することは困難であることから、ヒト in vitro 試験系を用いた予測が望ましい。

小腸における P-gp の輸送活性を再構築するために用いる *in vitro* 試験系の 1 つとして、P-gp 安定発現株を用いた経細胞輸送試験が挙げられる。過去に Adachi らは、野生型及び *mdr1a/1b* (-/-) マウスに対して *in situ* マウス小腸灌流試験を行い、野生型マウスに対する *mdr1a/1b* (-/-) マウスの頂端膜から基底側膜方向の PS product (膜透過係数と細胞膜表面積の積) の比 (*in situ* PS product ratio) を算出することで、マウス小腸における P-gp/*mdr1a* の輸送活性を調べている (Adachi et al., 2003). 彼らは同様に、P-gp 安定発現株及び親細胞に対して *in vitro* 経細胞輸送試験を行い、P-gp 安定発現株に対する親細胞の頂端膜から基底側膜方向の PS product の比 (*in vitro* PS_{a-to-b} ratio) を算出し、*in vitro* 試験における P-gp の輸送活性を調べている (Adachi et al., 2003). P-gp の基質薬を含む 12 化合物に関して *in situ* PS product ratio 及び *in vitro* PS_{a-to-b} ratio は相関したことから (Adachi et al., 2003), P-gp 安定発現株を用いた経細胞輸送試験を行うことによって、小腸における P-gp の輸送活性を再構築できる可能性がある。しかし、彼らの試験系において、*in situ* PS product ratio は、*in vitro* PS_{a-to-b} ratio と比べて 12 化合物の平均で約 1.8 倍小さい値を示した (Adachi et al., 2003). この差を示した一因として、マウス小腸と P-gp 安定発現株の P-gp/*mdr1a* のタンパク質発現量差が影響していると考えられる。

Uchida らは、マウス、サル及び病態モデルマウスの BBB における P-gp/*mdr1a* の排出活性について、P-gp/*mdr1a* 安定発現株を用いた経細胞輸送試験での *in vitro* P-gp 輸送活性を、P-gp/*mdr1a* 安定発現株と *in vivo* BBB のタンパク質発現量比で外挿することで *in vivo* P-gp 輸送活性を再構築できることに成功している (Uchida et al., 2011a; Uchida et al., 2014a; Uchida et al., 2014b). 従って、BBB で確立した手法を参考にすることで、小腸においても P-gp 安定発現株での経細胞試験系における *in vitro* P-gp 輸送活性について、P-gp/*mdr1a* 安定発現株と小腸での P-gp タンパク質発現量比で外挿することで小腸における P-gp の輸送活性を再構築できる可能性がある。

ヒト iPS 由来小腸上皮細胞を用いた小腸吸収性予測

ヒト小腸吸収性を *in vitro* 試験系から予測するために、ヒトプライマリー小腸細胞や小腸組織を用いた研究が行われ、それらの細胞透過性はヒト小腸吸収性と相関することが報告されてきた (Sjoberg et al., 2013; Takenaka et al., 2014). しかし、それらの生体由来試料は大量に入手することが困難であり、創薬研究での利用は限定される。一方、小腸マイクロソームに関しては、プライマリー小腸細胞に比べて入手し易く、製薬企業において小腸代謝を評価するために使用されている。Kadono ら及び Furukawa らは、種々の CYP3A4 の基質薬及び UGT 基質薬を用いて、ヒト $F_a \times F_g$ 値と小腸マイクロソームにおける固有クリアランスが相関することを示している (Kadono et al., 2010; Furukawa et al., 2012), しかし、彼らが評価した化合物群は高膜透過性で小腸吸収性が代謝律速となる化合物のみに限定されており、小腸吸収性が膜透過性によっても支配される化合物に対しては理論上予測できない。また、ヒト消化管吸収性を予測するための *in vitro* 細胞系として、結腸癌由来細胞株である Caco-2 細胞が創薬研究で広く用いられてきた。Caco-2 細胞は、ヒト F_a を予測するためのツールとして有用であるが (Artursson and Karlsson, 1991), 代謝酵素の発現量及び分子種が生体小腸と異なることが知られており、小腸代謝を評価することは難しいことが知られている (Prueksaritanont et al., 1996; Taipalensuu et al., 2001).

2007 年に山中伸弥らがヒト iPS 細胞 (human induced pluripotent stem cells) の樹立に関する論文を発表して以降 (Takahashi et al., 2007), 創薬研究への応用を目的とした iPS 細胞研究は飛躍的に盛んとなった。iPS 細胞は、様々な組織細胞に分化可能な多分化能を維持したまま永続的に増殖できる細胞である。組織細胞への発生過程を試験管内で再現することで、ヒト iPS 細胞から様々な組織細胞が作製することが可能となり、これまで入手が困難であったヒト細胞の供給源として創薬研究への活用が期待されている。小腸細胞については、2011 年に

Spence らによって、ヒト iPS 細胞から腸管オルガノイドを分化誘導する方法が初めて報告された (Spence et al., 2011). その研究を皮切りに、複数の研究機関によってヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞 (以下, iPS 小腸) が薬物の小腸吸収評価への有用性について数々の検証が行われてきた (Iwao et al., 2015; Ogaki et al., 2015; Ozawa et al., 2015; Kodama et al., 2016; Kabeya et al., 2017; Uchida et al., 2017). これらの研究において、iPS 小腸は、タイトジャンクションを形成し BCRP や PEPT1 のようなトランスポーター及び CYP3A4 や CES2 のような代謝酵素の発現及び機能を有することが確認されている (Iwao et al., 2015; Ogaki et al., 2015; Ozawa et al., 2015; Kodama et al., 2016; Kabeya et al., 2017; Uchida et al., 2017). iPS 小腸は、トランスポーター及び代謝酵素等、小腸吸収に関わる複数の分子種を発現した細胞であるため、それらの機能が生体の機能を反映するのであれば、iPS 小腸透過性から小腸吸収性を予測できると期待される.

第 5 節 本研究の目的

前節では、Uchida らが過去に報告した BBB における P-gp 機能の再構築法を小腸についても適応することで、小腸吸収に対する P-gp の影響を *in vitro* 試験から定量的に予測できる可能性について述べた。しかし小腸の場合は、脳毛細血管内皮細胞とは異なり微絨毛が発達し、*in vivo* と *in vitro* 間で細胞表面積が異なるため、BBB と同様に *in vivo* の機能を *in vitro* 試験から再構築できるかは不明である。また、小腸吸収性を予測するための新たな細胞系として、iPS 小腸の可能性についても述べた。しかし、iPS 小腸は、トランスポーター及び薬物代謝酵素の活性を有することがこれまで報告されているが、その活性が *in vivo* 小腸吸収特性を反映するかは不明である。

そこで本研究では第一に、マウス、サル及びヒト小腸において、P-gp を含めたトランスポーター及び代謝酵素のタンパク質発現量を測定し (第 2 章)、マウス P-gp/mdr1a 安定発現株における P-gp/mdr1a の単位発現量当たりの輸送活性を、第 2 章で得られたマウス小腸における P-gp/mdr1a のタンパク質発現量で外挿することで、マウス小腸における P-gp/mdr1a 輸送活性が再構築可能か検証することを目的とした (第 3 章)。第二に、iPS 小腸におけるトランスポーター及び代謝酵素活性が *in vivo* 吸収特性を反映するか明らかにすることを目的とした (第 4 章)。

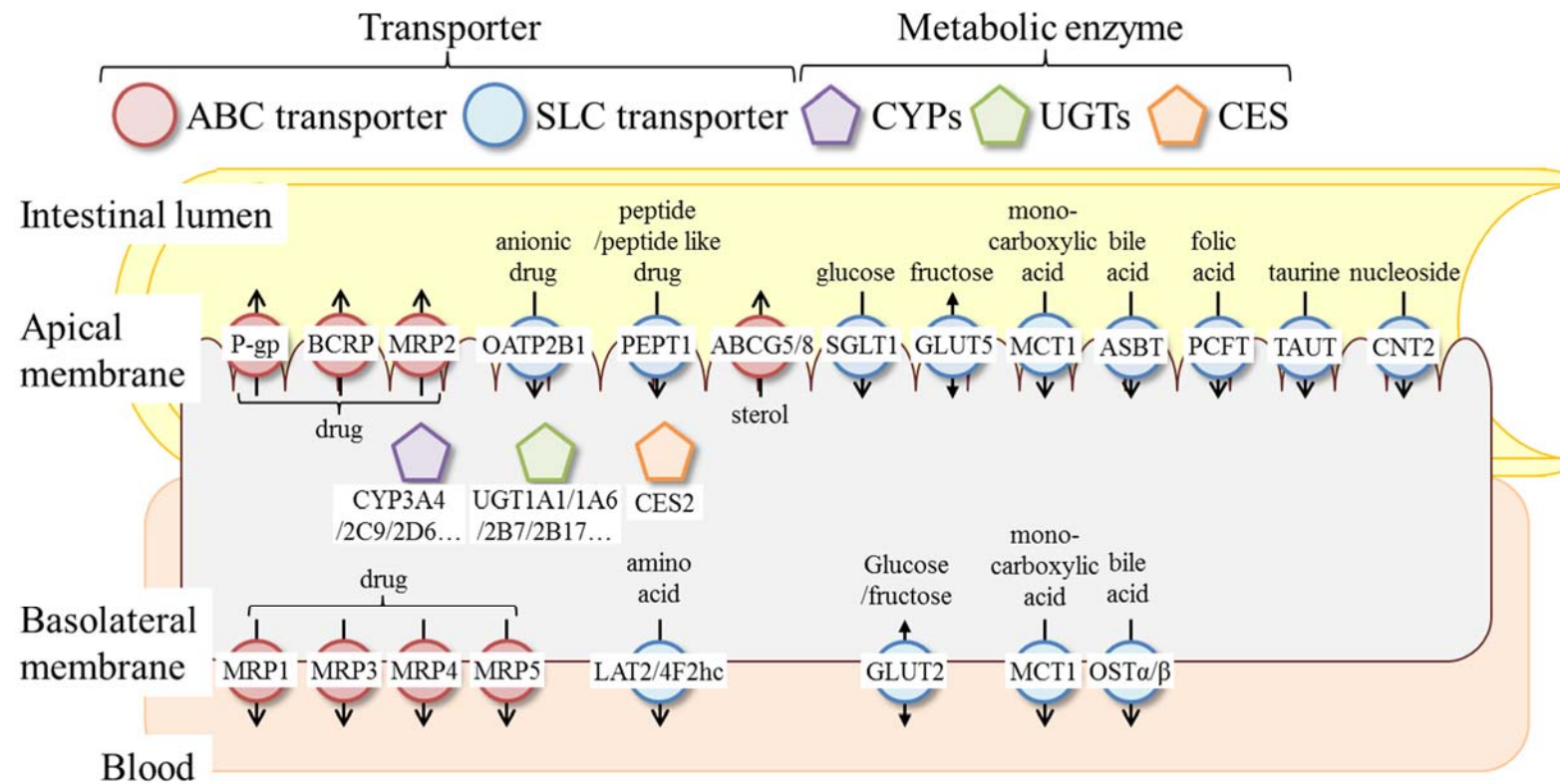


Figure 1-1. Transporters and metabolic enzymes in the small intestine

第2章 定量的プロテオミクスを用いたマウス、サル及びヒト小腸上皮細胞のトランスporter及び代謝酵素のタンパク質発現量の種差の解明

第1節 序論

トランスporter及び代謝酵素のタンパク質発現量はそれらの機能を反映することが報告されているため(Sy et al., 2002; Berggren et al., 2007; Ohtsuki et al., 2012), それらのタンパク質発現量を解析することは, in vitro/in vivo 差, 種差及び病態変動等の機能差の理解に繋がると考えられる. 2006 年に Paine らによって, 初めてヒト小腸発現する CYP 分子種のタンパク質発現量について定量ウェスタンブロット法を用いて網羅的に調べられた (Paine et al., 2006). しかし, ウェスタンブロット法は, 特異的な抗体の作製や網羅的解析におけるスループット性に課題がある. その後 2008 年に, Kamiie らによって LC-MS/MS を用いた膜タンパク質絶対定量法が開発された (Kamiie et al., 2008). 本手法は, プロテインデータベースにあるアミノ酸配列情報に基づいて, ターゲット分子特異的なペプチドを選択することで, 目的タンパクのタンパク質発現量をウェスタンブロット法よりも高いスループットで測定することが可能である (Kamiie et al., 2008). 近年では, 多くの研究者が本手法を用いてヒト小腸に発現するトランスporter及び代謝酵素の発現量を明らかにしている (Harbourt et al., 2012; Groer et al., 2013; Drozdziak et al., 2014; Groer et al., 2014; Harwood et al., 2015; Miyauchi et al., 2016; Nakamura et al., 2016).

小腸におけるトランスporter及び代謝酵素のタンパク質発現量解析では, どのような試料を用いて絶対発現量を取得するかという点が重要である. トランスporter及び代謝酵素は小腸上皮細胞に発現しているため, 小腸組織から単離した上皮細胞の純度が, 得られる発現量データの信頼性に影響する. 小腸上皮細胞の単離方法は, 上皮細胞を粘膜固有層や筋層から粘膜層ごとスライドグラスで剥離する方法 (Dickens and Weil-Malherbe, 1941), または, EDTA によって

上皮細胞間のカルシウム依存的な接着を乖離することで上皮細胞を単離する方法 (Evans et al., 1971) 等が用いられてきた。前者では、上皮細胞単離時の粘膜固有層や筋層の混入が懸念されるため、より純度の高い上皮細胞画分を得ることを考慮し、本研究では EDTA を用いた上皮細胞の単離を行った。

さらに、過去の小腸プロテオミクス研究では、単離した小腸上皮細胞におけるトランスポーター及び代謝酵素の発現量解析対象として、全細胞抽出液 (Harwood et al., 2015), ミクロソーム膜画分 (Harbourt et al., 2012; Groer et al., 2013; Drozdzik et al., 2014; Groer et al., 2014; Miyauchi et al., 2016; Nakamura et al., 2016) 及び細胞膜画分 (Miyauchi et al., 2016) と種々のサンプルが用いられてきた。トランスポーターの機能の場合は細胞膜, CYP 及び UGT の機能の場合はミクロソーム膜であり、トランスポーター及び代謝酵素の機能種差について議論する場合には、それらの機能する場であるサンプルを用いて定量するのが望ましい。実際に、全細胞抽出液でタンパク質発現解析を行った場合は、細胞質中に存在する分解されたペプチド断片もしくは活性のないタンパクも定量してしまうため、得られるタンパク質発現量データはその機能を過大評価されることが示唆されている (Wegler et al., 2017)。

そこで、本実験では、マウス、サル及びヒト小腸組織から EDTA を用いて小腸上皮細胞を単離し、トランスポーターについては細胞膜画分, CYP 及び UGT についてはミクロソーム膜画分におけるタンパク質発現量を測定し、小腸におけるそれらのタンパク質発現量種差を明らかにすることを目的とした。詳細は第 3 章で示すが、EDTA で単離したマウス小腸上皮細胞の細胞膜画分における *mdr1a* タンパク定量値はその機能と良好に相関することを示しており、各タンパクの機能の場とするサンプルを用いて定量を行うことが機能種差の比較には望ましいことを支持している。また、ヒト小腸では近年複数の研究機関で LC-MS/MS を用いたトランスポーター及び薬物代謝酵素のタンパク質発現量解析が

行われてきたが (Harbourt et al., 2012; Groer et al., 2013; Drozdzik et al., 2014; Groer et al., 2014; Harwood et al., 2015; Miyauchi et al., 2016; Nakamura et al., 2016), 発現量を動物間及び動物とヒト間で比較する場合には小腸上皮細胞を単離方法や膜画分の調製方法が統一されたサンプル同士で比較する必要がある. そこで, ヒト空腸及び回腸についても我々のマウス及びサルでの解析手法を用いて, トランスポーター及び薬物代謝酵素のタンパク質発現量解析を行った.

第2節 結果

小腸上皮細胞の単離方法の検討

ddY マウス (オス 10 匹, 9-10 週), カニクイザル (オス 1 匹, 4 歳 3 ヶ月), ヒト (男性 1 名 ; 22 歳, 女性 1 名 ; 74 歳) の小腸組織を摘出した (Table 2-1). 既報 (Evans et al., 1971) に従い, 摘出した小腸組織を 2 mM EDTA 及び 0.5 mM DTT を含む PBS 中で撹拌することで小腸上皮細胞を単離できるかをマウス小腸で検討した. マウス小腸上皮細胞単離後の小腸組織を顕微鏡で観察した結果, EDTA が含まれない PBS で撹拌したサンプルでは, 上皮細胞が残存しているが, EDTA を含んだ PBS で撹拌したサンプルでは小腸上皮細胞は残っていなかった (Figure 2-1). 従って, 2 mM EDTA 及び 0.5 mM DTT を含む PBS で撹拌することで小腸上皮細胞を単離可能と考えられた.

マウス十二指腸, 空腸, 回腸におけるトランスポーターのタンパク質発現量解析

10 匹の ddY マウスから十二指腸, 空腸及び回腸を摘出し, 各部位ごとに 10 匹分をプールした後, それぞれ小腸上皮細胞を単離し, 細胞膜画分を調製した. 46 分子のタンパク質発現量を LC-MS/MS で測定した結果, 3 部位いずれにおいても ABC トランスポーター 5 分子及び SLC トランスポーター 8 分子を含む計 16 分子のタンパク質発現が検出された (Table 2-2). 残りの 30 分子については, いずれの部位においてもピークが検出されず, 定量限界以下として定量限界値を算出した (Table 2-4).

ABC トランスポーターの中では, *mdr1a*, *bcrp*, *abcg5*, *abcg8* 及び *mrp4* の発現がいずれの部位においても検出された. SLC トランスポーターの中では, *glut1*, *sglt1*, *lat2*, *4f2hc*, *pept1*, *mct1*, *slc22a18* 及び *ostβ* の発現がいずれの部位においても検出された (Table 2-2).

Mdr1a 及び bcrp の発現は、小腸上部から下部にかけて発現が増大しており、回腸における mdr1a 及び bcrp の発現量は十二指腸よりも 1.82 倍及び 1.46 倍高かった。Sglt1, lat2 及び 4f2hc は、十二指腸よりも空腸及び回腸で高発現しており、mct1 及び ostβ は十二指腸及び空腸よりも回腸で高発現していた。

サル十二指腸、空腸、回腸におけるトランスポーターのタンパク質発現量解析

1 匹のカニクイザルから十二指腸、空腸及び回腸を摘出し、それぞれ小腸上皮細胞を単離し、細胞膜画分を調製した。45 分子のタンパク質発現量を LC-MS/MS で測定した結果、いずれかの部位において ABC トランスポーター 7 分子及び SLC トランスポーター 12 分子を含む計 21 分子のタンパク質発現が検出された (Table 2-2)。残りの 24 分子については、いずれの部位においてもピークが検出されず、定量限界以下として定量限界値を算出した (Table 2-5)。

十二指腸、空腸及び回腸の発現量を比較すると、BCRP, P-gp, OSTα 及び ABCG8 が最も回腸で発現が高く、十二指腸と比較してそれぞれ 1.55 倍, 1.44 倍, 4.85 倍及び 1.97 倍高く、空腸と比較してそれぞれ 1.63 倍, 1.59 倍, 6.78 倍及び 1.09 倍高かった。一方、MRP2, MRP4, SGLT1, MCT1, PCFT, MRP6, organic anion transporter 2 (OAT2) 及び Na⁺/K⁺-ATPase は十二指腸で最も発現が高く、空腸と比較してそれぞれ 1.18 倍, 1.34 倍, 1.31 倍, 2.45 倍, 1.56 倍, 1.37 倍, 1.20 倍及び 1.37 倍高く、回腸と比較してそれぞれ 1.94 倍, 1.57 倍, 2.16 倍, 2.87 倍以上, 12.7 倍以上, 2.30 倍, 1.09 倍以上及び 1.87 倍高かった。

ヒト空腸及び回腸におけるトランスポーターのタンパク質発現量解析

43 分子のタンパク質発現量を LC-MS/MS で測定した結果、いずれかの部位及びドナーにおいて ABC トランスポーター 10 分子及び SLC トランスポーター 21 分子を含む計 34 分子のタンパク質発現が検出された (Table 2-2)。残りの 21 分

子については、いずれの部位及びドナーにおいてもピークが検出されず、定量限界以下として定量限界値を算出した (Table 2-6).

十二指腸、空腸及び回腸の発現量を比較すると、P-gp, MCT1 及び ASBT は両ドナーで空腸よりも回腸で発現が高く、ドナー#1 ではそれぞれ 1.77 倍, 1.61 倍及び 3.52 倍以上高く、ドナー#2 ではそれぞれ 2.13 倍, 1.55 倍及び 3.72 倍以上高かった. Villin-1 は両ドナーで回腸よりも空腸で発現が高く、ドナー#1 では 1.58 倍高く、ドナー#2 では 1.82 倍高かった.

サル十二指腸、空腸、回腸における CYP 及び UGT のタンパク質発現量解析

9 分子のタンパク質発現量を LC-MS/MS で測定した結果、いずれの部位において 1 分子の CYP, 2 分子の UGT を含む計 4 分子のタンパク質発現が検出された (Table 2-3). 残りの 5 分子については、いずれの部位においてもピークが検出されず、定量限界以下として定量限界値を算出した (Table 2-7).

十二指腸、空腸及び回腸の発現量を比較すると、CYP3A8 及び NADPH450 reductase (P450R) は回腸よりも十二指腸及び空腸で発現が高く、十二指腸ではそれぞれ 3.01 倍及び 1.62 倍高く、空腸ではそれぞれ 3.30 倍及び 2.21 倍高かった.

ヒト空腸及び回腸における CYP 及び UGT のタンパク質発現量解析

23 分子のタンパク質発現量を LC-MS/MS で測定した結果、いずれかの部位及びドナーにおいて 7 分子の CYP, 4 分子の UGT を含む計 12 分子のタンパク質発現が検出された (Table 2-3). 残りの 11 分子については、いずれの部位においてもピークが検出されず、定量限界以下として定量限界値を算出した (Table 2-8).

十二指腸、空腸及び回腸の発現量を比較すると、CYP3A4 は空腸よりも回腸で発現が高く、ドナー#1 及び#2 でそれぞれ 1.30 倍及び 1.31 倍高かった.

マウス、サル及びヒト小腸におけるトランスポータータンパク質発現量の種差解析

マウス-ヒト間及びサル-ヒト間比較では、ヒト検体の個人差の影響を考慮し、2 ドナーのいずれにおいても共通して有意に高いもしくは低い場合においてのみ、動物-ヒト間でタンパク質発現量に種差があるとした。一方、マウスとサルの比較においては、両者の発現量に有意に差がある場合に種差があるとした。

空腸の BCRP の発現量はサルよりもヒトドナー#1 及び#2の方がそれぞれ 2.39 倍及び 1.15 倍高かったが、回腸の発現量には両者に種差は認められなかった。一方、サル十二指腸、空腸及び回腸の発現量は、マウスのそれらよりもそれぞれ 1.59 倍、1.43 倍及び 1.69 倍高かった。

P-gp については、サルの十二指腸、空腸及び回腸の発現量がそれぞれ 1.19 倍、1.91 倍及び 1.51 倍マウス *mdr1a* よりも高かったが、サル及びヒト間では、空腸及び回腸のいずれにおいても種差が認められなかった。

ヒト CYP3A4 と最も相同性の高い分子種は、カンクイザルでは CYP3A8 であることが報告されている (アミノ酸相同性; 93%) (Iwasaki and Uno, 2009)。空腸では、サル CYP3A8 はドナー#1 及び#2 と比較して、それぞれ 5.31 倍 3.34 倍高かった。回腸では、サル CYP3A8 とヒト CYP3A4 で有意な差は認められなかった。

UGT1A1 については、統計学的な有意差はなかったが、空腸ではヒトドナー#1 及び#2 よりもサルでそれぞれ 192 倍以上及び 4.57 倍高く、回腸ではヒトドナー#1 及び#2 よりもサルでそれぞれ 141 倍以上及び 3.11 倍高かった。一方で UGT1A6 については、統計学的な有意差はなかったが、空腸ではヒトドナー#1 及び#2 よりもサルでそれぞれ 49.5 倍以上及び 16.1 倍高く、回腸ではヒトドナー#1 及び#2 よりもサルでそれぞれ 25.7 倍以上及び 8.57 倍高かった。

本研究では、定量したトランスポーター分子種のうち、類似した機能を有するトランスポーターについて、1) 頂端膜の薬物排出トランスポーター (BCRP/*bcrp*,

P-gp/MDR1/mdr1a 及び MRP2/mrp2), 2) 基底側膜の薬物トランスポーター (OST α /ost α , OST β /ost β , MRP3/mrp3, MRP4/mrp4, MRP1/mrp1 及び MRP5/mrp5), 3) ヘキソース/モノカルボン酸トランスポーター (SGLT1/sglt1, GLUT5/glut5, GLUT2/glut2, GLUT1/glut1 及び MCT1/mct1) の3つのカテゴリーに分類した. 各カテゴリーに含まれる全トランスポーターのタンパク質発現量の合計に対する各々のトランスポーターの相対的発現量 (%) を算出した (Figure 2-2).

頂端膜の薬物排出トランスポーターの中では, サル及びヒトにおいて, 全ての部位で BCRP が最も発現が高かったが, マウスでは, 全ての部位で mdr1a が最も発現が高かった.

基底側膜の薬物トランスポーターの中では, マウスでは ost β が全ての部位において最も発現が高かった. サルでは OST α が全ての部位において最も発現が高かった. ヒトでは MRP4 がドナー#1 の空腸及び回腸で最も発現が高く, ドナー#2 の空腸及び回腸では, OST α の発現量が最も高かった.

ヘキソース/モノカルボン酸トランスポーターの中では, サルでは十二指腸及び回腸では SGLT1 の発現量が最も高く, 空腸では GLUT5 が最も高発現していた. ヒトではドナー#1 の空腸及び両ドナーの空腸及び回腸では SGLT1 の発現量が最も高く, ドナー#1 の回腸では GLUT1 が最も高発現していた. マウスでは mct1 が全ての部位において最も発現が高かった.

Table 2-1 Sample Information of Mouse, Monkey, and Human Small Intestine

Species	Strain (mouse, monkey)	Age	Sex	Drug history	Notes
	Race (human)				
Mouse	ddY	9-10 weeks	Male	None	-
Monkey	Cynomolgus	4 years 3 months	Male	None	Origin; Indonesia
Human donor #1	Caucasian	74 years	Female	Novocaine, codeine	Cause of death; COPD BMI; 21.5
Human donor #2	Caucasian	22 years	Male	Levofloxacin, vancomycin, haloperidol, prednisone, Cyclophosphamide	Cause of death; Wegener's disease BMI; 27.0

BMI, body-mass index; COPD, chronic obstructive pulmonary disease

The monkey was the same individual used in the previous report (Ito et al., 2011)

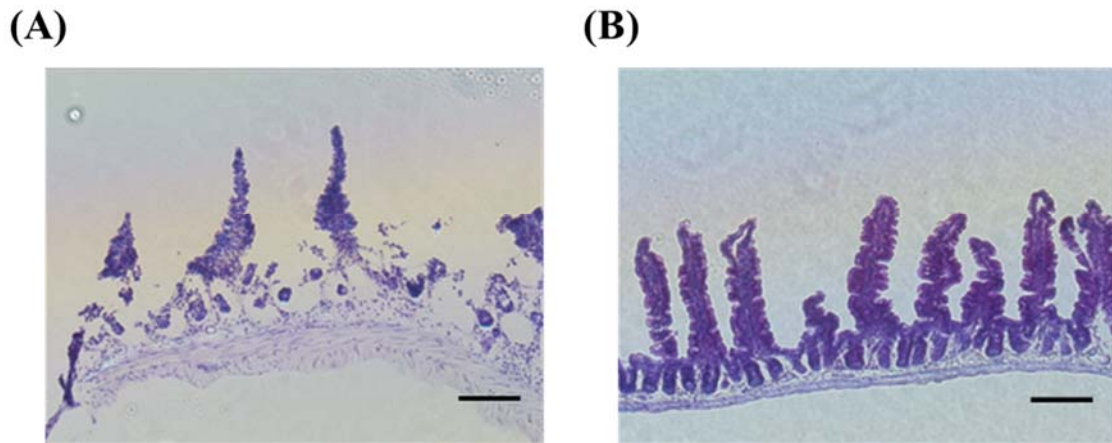


Figure 2-1 Mouse small intestinal epithelial cells isolated by EDTA treatment. Intestinal epithelial cells were isolated by agitation in isolation buffer [phosphate-buffered saline (PBS) with 2 mM EDTA and 0.5 mM dithiothreitol]. Under anesthesia with pentobarbital (25.9 mg/kg), the mouse was decapitated and the small intestine was removed. All of the following procedures were performed at 4 °C. The small intestine was removed from ddY mice and cut into 1 cm pieces. The pieces were agitated in isolation buffer for 1 hour and epithelial cells were isolated. To confirm that epithelial cells had been isolated, hematoxylin and eosin staining of mouse small intestinal segments after agitation in PBS with EDTA or without EDTA was carried out. The segments were fixed in 4 % paraformaldehyde in phosphate buffer (PB) (0.19 mM NaH_2PO_4 and 0.81 mM Na_2HPO_4), cryoprotected in 30% in PB sucrose overnight at 4 °C and frozen in OCT compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Tokyo, Japan) at -20 °C. Frozen intestinal segments were cut with a cryostat at 10 μm thickness and the sections were mounted on slide glass. After washing in PBS, the sections were stained with hematoxylin and eosin, washed in water, and dehydrated with several changes of 70 % ethyl alcohol, 90% ethyl alcohol, 100% ethyl alcohol, and xylene. Microscopic image showed that in jejunal frozen sections after agitation in PBS with EDTA, the epithelial cells had been detached (A). In contrast, after

agitation in PBS without EDTA, the epithelial cells remained (B). Scale bar represents 100 μm .

Table 2-2. Protein Expression Levels of Transporters in Plasma Membrane Fractions in Mouse, Monkey and Human Small Intestine.

Molecule	Region	Expression level (fmol/μg plasma membrane protein)			
		Mouse	Monkey	Human #1	Human #2
Apical drug efflux transporter					
BCRP / bcrp	Duodenum	4.79 ± 0.18 ^{##,\$\$}	7.62 ± 0.35 ^{#,ll}	Not measured	Not measured
	Jejunum	5.05 ± 0.18 ^{##,\$\$,¶¶,‡‡}	7.23 ± 0.30 ^{#,ll,¶¶,‡}	3.03 ± 0.03 ^{ll,\$\$,‡‡}	6.26 ± 0.20 ^{##,ll,\$\$,¶¶}
	Ileum	6.97 ± 0.22 ^{**,††,\$\$,¶¶,‡‡}	11.8 ± 1.0 ^{*,†,l,¶¶}	3.03 ± 0.11 ^{ll,\$\$,‡‡}	13.1 ± 0.4 ^{††,ll,¶¶}
P-gp / MDR1 / mdr1a	Duodenum	5.22 ± 0.38 ^{†,##}	4.38 ± 0.19 [#]	Not measured	Not measured
	Jejunum	7.57 ± 0.52 ^{*,\$\$,¶¶,‡‡}	3.96 ± 0.35 ^{##,ll,¶¶}	1.37 ± 0.05 ^{##,ll,\$\$,‡‡}	3.49 ± 0.23 ^{##,ll,¶¶}
	Ileum	9.48 ± 0.45 ^{**,\$\$,¶¶,‡}	6.29 ± 0.26 ^{*,††,ll,¶¶,‡‡}	2.43 ± 0.07 ^{††,ll,\$\$,‡‡}	7.42 ± 0.14 ^{††,l,\$\$,¶¶}
MRP2 / mrp2	Duodenum	ULQ (<0.185)	2.76 ± 0.17 [#]	Not measured	Not measured
	Jejunum	ULQ (<0.190)	2.34 ± 0.18 ^{¶¶,‡‡}	0.280 ± 0.013 ^{\$\$,‡‡}	1.39 ± 0.11 ^{\$\$,¶¶}
	Ileum	ULQ (<0.209)	1.42 ± 0.29 [*]	ULQ (<0.205)	1.16 ± 0.08
Basolateral drug transporter					

OST α / ost α	Duodenum	Not measured	18.1 \pm 2.0 ^{##}	Not measured	Not measured
	Jejunum	Not measured	12.9 \pm 1.2 ^{##,††}	ULQ (<0.557)	4.63 \pm 0.40 ^{##,\$\$}
	Ileum	Not measured	87.8 \pm 9.0 ^{**,††,¶¶,‡‡}	0.556 \pm 0.074 ^{\$\$,‡‡}	9.56 \pm 0.22 ^{††,\$\$,¶¶}
OST β / ost β	Duodenum	4.08 \pm 0.21 ^{##,\$\$}	5.84 \pm 0.33	Not measured	Not measured
	Jejunum	5.31 \pm 0.54 ^{##,\$}	7.18 \pm 0.54 ^l	Not measured	Not measured
	Ileum	31.9 \pm 1.5 ^{**,††,\$\$}	9.78 \pm 2.24	Not measured	Not measured
MRP3 / mrp3	Duodenum	ULQ (<0.251)	0.670 \pm 0.015	Not measured	Not measured
	Jejunum	ULQ (<0.232)	0.462 \pm 0.011	ULQ (<0.213)	0.501 \pm 0.047 [#]
	Ileum	ULQ (<0.231)	0.514 \pm 0.075	ULQ (<0.129)	0.303 \pm 0.027 [†]
MRP4 / mrp4	Duodenum	0.188 \pm 0.010 ^{##,\$\$}	0.670 \pm 0.019 ^{††,##,}	Not measured	Not measured
	Jejunum	0.168 \pm 0.000 ^{##,\$\$,¶¶,‡‡}	0.499 \pm 0.023 ^{**, ,¶¶}	0.323 \pm 0.009 ^{##, ,\$\$,‡‡}	0.555 \pm 0.023 ^{,¶¶}
	Ileum	0.240 \pm 0.011 ^{*,†,\$\$,¶¶,‡‡}	0.427 \pm 0.011 ^{**, ,¶¶,‡}	0.613 \pm 0.024 ^{††, ,\$\$,‡‡}	0.487 \pm 0.017 ^{,\$\$,¶¶}
MRP1 / mrp1	Duodenum	ULQ (<0.122)	ULQ (<0.267)	Not measured	Not measured
	Jejunum	ULQ (<0.117)	ULQ (<0.279)	0.206 \pm 0.010 ^{‡‡}	0.503 \pm 0.012 ^{¶¶}
	Ileum	ULQ (<0.0981)	ULQ (<0.253)	0.395 \pm 0.062	0.467 \pm 0.019

	Duodenum	ULQ (<0.435)	ULQ (<0.262)	Not measured	Not measured
MRP5 / mrp5	Jejunum	ULQ (<0.420)	ULQ (<0.285)	ULQ (<0.111)	0.205 ± 0.012 ^{##}
	Ileum	ULQ (<0.415)	ULQ (<0.276)	ULQ (<0.0629)	0.124 ± 0.018 ^{††}
Apical drug influx transporter					
	Duodenum	4.95 ± 0.77	6.82 ± 0.51	Not measured	Not measured
PEPT1 / pept1	Jejunum	6.92 ± 0.69 ^{¶,††}	8.08 ± 0.80 ^{¶,†,‡‡}	3.57 ± 0.28 ^{#,‡,§,††}	13.1 ± 0.8 ^{##,‡,§,¶}
	Ileum	6.71 ± 1.54 ^{¶,††}	5.29 ± 1.00 ^{¶,††}	1.86 ± 0.31 ^{†,‡,§,††}	19.5 ± 1.2 ^{††,‡,§,¶}
	Duodenum	ULQ (oatp1a1; <0.0936, oatp1a4; <0.969)	ULQ (<0.439)	Not measured	Not measured
OATP1A2 / oatp1a1 (oatp1), oatp1a4 (oatp2)	Jejunum	ULQ (oatp1a1; <0.0827, oatp1a4; <0.950)	ULQ (<0.455)	ULQ (<0.0912)	0.336 ± 0.074
	Ileum	ULQ (oatp1a1; <0.0782, oatp1a4; <0.934)	ULQ (<0.503)	ULQ (<0.0622)	0.189 ± 0.033
Hexose / monocarboxylate transporter					
SGLT1 / sglt1	Duodenum	7.01 ± 0.67 ^{††,‡,§}	25.8 ± 1.9 ^{##,‡}	Not measured	Not measured

	Jejunum	10.6 ± 0.1 ^{**,¶¶,‡‡}	19.7 ± 1.2 ^{#,¶¶,‡‡}	59.3 ± 3.2 ^{#,¶¶,‡‡}	165 ± 9 ^{##,¶¶,‡‡}
	Ileum	10.3 ± 0.5 ^{*,§§,¶¶,‡‡}	12.0 ± 0.5 ^{**,‡,¶¶,‡‡}	46.0 ± 1.9 ^{‡,¶¶,‡‡}	423 ± 17 ^{‡‡,¶¶,‡‡}
GLUT5 / glut5	Duodenum	not measured	18.1 ± 3.1	Not measured	Not measured
	Jejunum	not measured	20.0 ± 2.3 ^{¶¶}	2.63 ± 0.01 ^{##,§§,‡‡}	13.1 ± 0.7 ^{##,¶¶}
	Ileum	not measured	10.0 ± 0.8 ^{¶¶,‡‡}	1.61 ± 0.04 ^{‡‡,§§,‡‡}	37.9 ± 2.2 ^{‡‡,§§,¶¶}
GLUT2 / glut2	Duodenum	not measured	9.87 ± 1.33	Not measured	Not measured
	Jejunum	not measured	13.6 ± 1.0 ^{‡‡}	ULQ (<0.967)	1.30 ± 0.17 ^{##,§§}
	Ileum	not measured	ULQ (<2.52)	ULQ (<1.01)	4.07 ± 0.44 ^{‡‡}
GLUT1 / glut1	Duodenum	1.58 ± 0.02 ^{‡‡,##,§}	0.941 ± 0.085 [‡]	Not measured	Not measured
	Jejunum	0.619 ± 0.030 ^{**,##,¶¶,‡‡}	0.617 ± 0.070 ^{¶¶,‡‡}	31.5 ± 1.1 ^{##,¶¶,‡‡}	3.76 ± 0.20 ^{##,¶¶,‡‡}
	Ileum	1.20 ± 0.01 ^{**,‡‡,¶¶}	0.788 ± 0.168 ^{¶¶,‡}	50.1 ± 0.9 ^{‡‡,¶¶,‡‡}	1.21 ± 0.06 ^{‡‡,§,¶¶}
MCT1 / mct1	Duodenum	27.6 ± 1.2 ^{#,§§}	2.70 ± 0.20 ^{‡‡,¶¶}	Not measured	Not measured
	Jejunum	25.1 ± 1.1 ^{#,§§,¶¶,‡‡}	1.10 ± 0.12 ^{**,¶¶,‡‡}	0.782 ± 0.046 ^{##,¶¶,‡‡}	2.29 ± 0.14 ^{##,¶¶,‡‡}
	Ileum	37.7 ± 2.5 ^{*,‡,¶¶,‡‡}	ULQ (<0.941)	1.26 ± 0.07 ^{‡‡,¶¶,‡‡}	3.55 ± 0.17 ^{‡‡,¶¶,‡‡}
Other endogenous transporter					

PCFT / pcft	Duodenum	Not measured	7.73 ± 0.43 ^{††}	Not measured	Not measured
	Jejunum	Not measured	4.96 ± 0.18 ^{**,¶¶,‡‡}	1.47 ± 0.04 ^{##,§§,‡‡}	2.02 ± 0.08 ^{##,§§,¶¶}
	Ileum	Not measured	ULQ (<0.610)	0.821 ± 0.020 ^{††,‡‡}	3.68 ± 0.17 ^{††,¶¶}
TAUT / taut	Duodenum	ULQ (<0.139)	3.93 ± 0.22	Not measured	Not measured
	Jejunum	ULQ (<0.165)	2.97 ± 0.10 ^{¶¶,‡‡}	0.229 ± 0.013 ^{§§,‡‡}	0.635 ± 0.023 ^{##,§§,¶¶}
	Ileum	ULQ (<0.172)	2.62 ± 0.54 [¶]	0.180 ± 0.018 ^{§,‡‡}	1.60 ± 0.05 ^{††,¶¶}
ABCG8 / abcg8	Duodenum	2.16 ± 0.07 ^{††,§§}	1.39 ± 0.09 ^{††,##,¶¶}	Not measured	Not measured
	Jejunum	3.16 ± 0.17 ^{**,§,¶¶,‡‡}	2.52 ± 0.09 ^{**,¶,¶¶,‡‡}	0.621 ± 0.015 ^{#,¶,§§,‡‡}	3.92 ± 0.07 ^{##,¶,§§,¶¶}
	Ileum	2.68 ± 0.06 ^{¶¶,‡‡}	2.74 ± 0.19 ^{**,¶¶,‡‡}	0.549 ± 0.022 ^{†,¶,§§,‡‡}	7.72 ± 0.23 ^{††,¶,§§,¶¶}
ABCG5 / abcg5	Duodenum	2.62 ± 0.34	ULQ (<0.331)	Not measured	Not measured
	Jejunum	3.62 ± 0.3	ULQ (<0.313)	Not measured	Not measured
	Ileum	3.11 ± 0.25	ULQ (<0.398)	Not measured	Not measured
LAT2 / lat2	Duodenum	17.1 ± 0.5 ^{†, #}	Not measured	Not measured	Not measured
	Jejunum	21.1 ± 0.4 [*]	Not measured	Not measured	Not measured
	Ileum	19.9 ± 0.4 [*]	Not measured	Not measured	Not measured

	Duodenum	Not measured	1.09 ± 0.11	Not measured	Not measured
CNT1 / cnt1	Jejunum	Not measured	1.00 ± 0.10 ^{¶¶}	0.171 ± 0.016 ^{§§,‡‡}	0.840 ± 0.034 ^{##,¶¶}
	Ileum	Not measured	0.515 ± 0.111 [‡]	ULQ (<0.124)	1.07 ± 0.02 ^{‡‡,§}
	Duodenum	Not measured	ULQ (<0.193)	Not measured	Not measured
CNT2 / cnt2	Jejunum	Not measured	ULQ (<0.200)	0.442 ± 0.027 ^{‡‡}	2.99 ± 0.11 ^{¶¶}
	Ileum	Not measured	ULQ (<0.206)	ULQ (<0.0683)	3.23 ± 0.09
	Duodenum	ULQ (<0.500)	ULQ (<3.86)	Not measured	Not measured
ENT1 / ent1	Jejunum	ULQ (<0.495)	ULQ (<3.88)	4.16 ± 0.73	ULQ (<1.56)
	Ileum	ULQ (<0.488)	ULQ (<4.04)	5.40 ± 0.23 ^{‡‡}	1.60 ± 0.29 ^{¶¶}
	Duodenum	32.3 ± 1.2 ^{‡‡,##}	ULQ (<1.49)	Not measured	Not measured
4F2hc / 4f2hc	Jejunum	62.2 ± 2.2 ^{**,¶¶,‡‡}	ULQ (<1.55)	0.730 ± 0.094 ^{¶¶,‡‡}	4.52 ± 0.09 ^{##,¶¶,¶¶}
	Ileum	59.3 ± 0.9 ^{**,¶¶,‡‡}	ULQ (<1.44)	0.944 ± 0.078 ^{¶¶,‡‡}	9.15 ± 0.10 ^{‡‡,¶¶,¶¶}
	Duodenum	ULQ (<0.266)	ULQ (<0.294)	Not measured	Not measured
ASBT / asbt	Jejunum	ULQ (<0.263)	ULQ (<0.297)	ULQ (<0.120)	ULQ (<0.381)
	Ileum	ULQ (<0.353)	ULQ (<0.329)	0.422 ± 0.054 ^{‡‡}	1.42 ± 0.16 ^{¶¶}

Localization unknown transporters					
SLC22A18 / slc22a18	Duodenum	5.91 ± 0.53	Not measured	Not measured	Not measured
	Jejunum	3.68 ± 0.45 [‡]	Not measured	ULQ (<0.727)	5.32 ± 0.13 ^{##,l}
	Ileum	3.75 ± 0.52	Not measured	ULQ (<0.719)	2.25 ± 0.08 ^{††}
MRP6 / mrp6	Duodenum	ULQ (<0.541)	2.23 ± 0.10 ^{##}	Not measured	Not measured
	Jejunum	ULQ (<0.532)	1.63 ± 0.14 [‡]	ULQ (<0.0896)	0.376 ± 0.014 ^{##,\$}
	Ileum	ULQ (<0.531)	0.969 ± 0.128 ^{**‡}	ULQ (<0.0796)	0.250 ± 0.003 ^{††,\$}
OAT2 / oat2	Duodenum	ULQ (<0.910)	0.568 ± 0.014 ^{††}	Not measured	Not measured
	Jejunum	ULQ (<0.849)	0.475 ± 0.009 ^{**‡‡}	ULQ (<0.110)	0.336 ± 0.021 ^{\$\$}
	Ileum	ULQ (<0.879)	ULQ (<0.519)	0.120 ± 0.021 ^{‡‡}	0.283 ± 0.016 ^{¶¶}
OCT3 / oct3	Duodenum	ULQ (<0.554)	ULQ (<0.264)	Not measured	Not measured
	Jejunum	ULQ (<0.520)	ULQ (<0.277)	ULQ (<0.0112)	0.551 ± 0.125
	Ileum	ULQ (<0.544)	ULQ (<0.200)	ULQ (<0.0551)	ULQ (<0.190)
PEPT2 / pept2	Duodenum	Not measured	Not measured	Not measured	Not measured
	Jejunum	Not measured	Not measured	ULQ (<0.107)	0.548 ± 0.004 ^{##}

	Ileum	Not measured	Not measured	ULQ (<0.0881)	0.385 ± 0.005 ^{††}
OAT3 / oat3	Duodenum	ULQ (<1.10)	ULQ (<0.257)	Not measured	Not measured
	Jejunum	ULQ (<1.05)	ULQ (<0.172)	ULQ (<0.0988)	0.277 ± 0.023
	Ileum	ULQ (<1.09)	ULQ (<0.174)	ULQ (<0.0850)	ULQ (<0.168)
OATP1B3 / oatp1b2 (oatp4)	Duodenum	ULQ (<0.361)	ULQ (<0.194)	Not measured	Not measured
	Jejunum	ULQ (<0.360)	ULQ (<0.196)	ULQ (<0.0580)	0.272 ± 0.011 ^{##}
	Ileum	ULQ (<0.363)	ULQ (<0.188)	ULQ (<0.0507)	0.217 ± 0.004 ^{††}
MDR3 / mdr2	Duodenum	ULQ (<0.102)	Not measured	Not measured	Not measured
	Jejunum	ULQ (<0.103)	Not measured	ULQ (<0.0931)	0.227 ± 0.011 [#]
	Ileum	ULQ (<0.103)	Not measured	ULQ (<0.0718)	0.168 ± 0.016 [†]
Others					
villin-1	Duodenum	12.8 ± 0.3 ^{†,##}	12.2 ± 1.4	Not measured	Not measured
	Jejunum	21.6 ± 0.4 ^{*,§,¶,‡‡}	13.8 ± 1.6 ^{‡‡}	10.1 ± 0.1 ^{##,¶,‡‡}	27.6 ± 0.5 ^{##,¶,§§,¶¶}
	Ileum	23.2 ± 2.1 ^{**,§§,¶¶,‡}	11.5 ± 1.4 ^{¶¶}	6.41 ± 0.16 ^{††,¶,§,‡‡}	15.2 ± 0.3 ^{††,¶¶}
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Duodenum	397 ± 17 ^{§§}	321 ± 9 ^{††,##,¶¶}	Not measured	Not measured

	Jejunum	445 ± 19 ^{§§,¶,‡‡}	235 ± 14 ^{*,#,¶,‡‡}	51.6 ± 3 ^{##,¶,§§,‡‡}	99.5 ± 3.2 ^{##,¶,§§,¶¶}
	Ileum	409 ± 9 ^{§§,¶,‡‡}	172 ± 6 ^{*,‡,¶,¶,‡‡}	27.7 ± 2.8 ^{‡‡,¶,§§,‡‡}	297 ± 23 ^{‡‡,¶,§,¶¶}
	Duodenum	4.39 ± 0.16 ^{††}	ULQ (<2.19)	Not measured	Not measured
γ -GTP / γ -gtp	Jejunum	6.60 ± 0.15 ^{*,##,¶,‡‡}	ULQ (<0.333)	1.84 ± 0.12 ^{¶,‡}	2.22 ± 0.08 ^{##,¶¶}
	Ileum	4.62 ± 0.13 ^{‡‡,¶,‡‡}	ULQ (<0.419)	2.11 ± 0.03 ^{¶,‡‡}	3.57 ± 0.16 ^{‡‡,¶,¶¶}

The protein expression levels (mean ± S.E.M.) were determined in three or four sets of transitions in one plasma membrane sample of isolated small intestinal epithelial cells from ten ddY mice, one cynomolgus monkey, and human donor #1, #2. Nomenclature is given in capital letters for the human or monkey homolog, and lower-case letters for the mouse homolog. * and ** indicate significant difference of the quantitative value compared with the duodenum (p<0.05 and p<0.01, respectively). † and †† indicate significant difference of the quantitative value compared with the jejunum (p<0.05 and p<0.01, respectively). # and ## indicate significant difference of the quantitative value compared with the ileum (p<0.05 and p<0.01, respectively). † and †† indicate significant difference of the quantitative value compared with mouse (p<0.05 and p<0.01, respectively). § and §§ indicate significant difference of the quantitative value compared with monkey (p<0.05 and p<0.01, respectively). ¶ and ¶¶ indicate significant difference of the quantitative value compared with human donor #1 (p<0.05 and p<0.01, respectively). ‡ and ‡‡ indicate significant difference of the quantitative value compared with human donor #2 (p<0.05 and p<0.01, respectively). ULQ represents under the limit of quantification (LQ) and the values of LQ were calculated according to the

previous reports (Uchida et al., 2011b; Uchida et al., 2015) as described in the Experimental Section.

Table 2-3. Protein Expression Levels of CYPs and UGTs in Microsomal Membrane Fractions in Monkey and Human Small Intestine

Molecule	Region	Expression level (fmol/μg microsomal membrane protein)		
		Monkey	Human #1	Human #2
CYP				
CYP3A8 (monkey) / CYP3A4 (human)	Duodenum	30.0 ± 0.9 ^{##}	Not measured	Not measured
	Jejunum	32.9 ± 0.7 ^{##,¶¶,‡‡}	6.20 ± 0.36 ^{#,§§,‡‡}	9.84 ± 0.43 ^{##,§§,¶¶}
	Ileum	9.97 ± 0.54 ^{**,††,¶¶,‡‡}	8.03 ± 0.40 ^{†,§,‡‡}	12.9 ± 0.5 ^{††,§,¶¶}
CYP2C9	Duodenum	Not measured	Not measured	Not measured
	Jejunum	Not measured	0.507 ± 0.093 ^{‡‡}	3.74 ± 0.25 ^{¶¶}
	Ileum	Not measured	0.722 ± 0.084 ^{‡‡}	3.23 ± 0.08 ^{¶¶}
CYP2C18	Duodenum	Not measured	Not measured	Not measured
	Jejunum	Not measured	ULQ (<0.122)	1.50 ± 0.11 [#]
	Ileum	Not measured	ULQ (<0.122)	0.961 ± 0.051 [†]
CYP2D6	Duodenum	Not measured	Not measured	Not measured

	Jejunum	Not measured	ULQ (<0.140)	1.18 ± 0.10
	Ileum	Not measured	ULQ (<0.139)	1.16 ± 0.05
CYP2J2	Duodenum	Not measured	Not measured	Not measured
	Jejunum	Not measured	ULQ (<4.15)	5.28 ± 0.42
	Ileum	Not measured	2.71 ± 0.77 [‡]	5.55 ± 0.46 [¶]
CYP4A11	Duodenum	Not measured	Not measured	Not measured
	Jejunum	Not measured	ULQ (<0.126)	0.246 ± 0.010 ^{##}
	Ileum	Not measured	ULQ (<0.122)	0.129 ± 0.013 ^{††}
CYP51A1	Duodenum	Not measured	Not measured	Not measured
	Jejunum	Not measured	0.722 ± 0.054 ^{‡‡}	1.33 ± 0.09 ^{¶¶}
	Ileum	Not measured	0.704 ± 0.033 ^{‡‡}	1.07 ± 0.09 ^{¶¶}
UGT				
UGT1A1	Duodenum	19.0 ± 2.0	Not measured	Not measured
	Jejunum	20.9 ± 1.5 ^{‡‡}	ULQ (<0.109)	4.57 ± 0.22 ^{\$\$}
	Ileum	15.7 ± 0.5 ^{‡‡}	ULQ (<0.111)	5.05 ± 0.38 ^{\$\$}

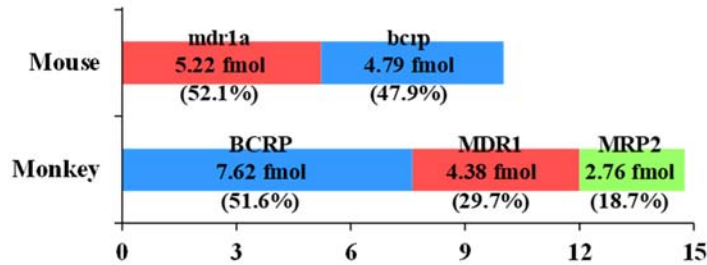
UGT1A6	Duodenum	25.3 ± 4.5	Not measured	Not measured
	Jejunum	28.4 ± 8.4	ULQ (<0.574)	1.76 ± 0.17
	Ileum	13.2 ± 3.7	ULQ (<0.513)	1.54 ± 0.10
UGT2B7	Duodenum	Not measured	Not measured	Not measured
	Jejunum	Not measured	ULQ (<2.11)	5.29 ± 0.48
	Ileum	Not measured	ULQ (<2.13)	5.59 ± 0.63
UGT2B17	Duodenum	Not measured	Not measured	Not measured
	Jejunum	Not measured	4.91 ± 0.12 ^{##,‡‡}	50.7 ± 2.3 ^{##,¶¶}
	Ileum	Not measured	7.63 ± 0.32 ^{††,‡‡}	33.7 ± 1.3 ^{††,¶¶}
Others				
P450R	Duodenum	2.64 ± 0.18 ^{†, #}	Not measured	Not measured
	Jejunum	3.60 ± 0.15 ^{*, ##, ‡‡}	ULQ (<9.14)	6.80 ± 0.35 ^{§§}
	Ileum	1.63 ± 0.06 ^{*, ††, ‡‡}	ULQ (<4.86)	6.67 ± 0.48 ^{§§}

The protein expression levels (mean ± S.E.M.) were determined in three or four sets of transitions in one microsomal membrane sample of isolated small intestinal epithelial cells from one cynomolgus monkey and human donor #1, #2. * and ** indicate significant difference

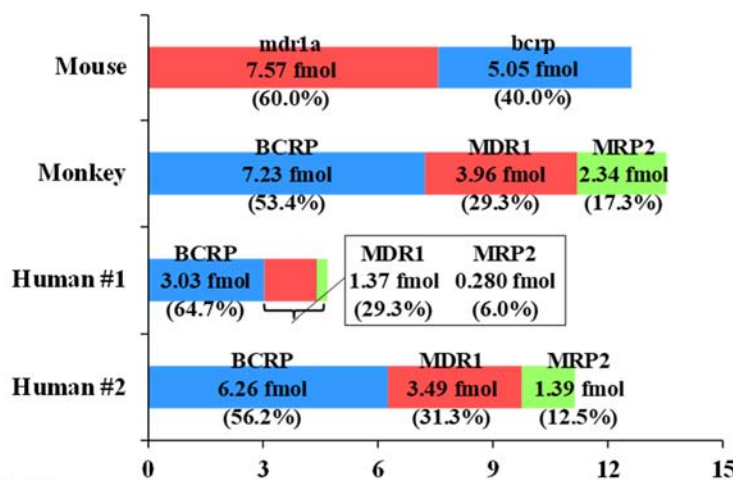
of the quantitative value compared with the duodenum ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively). [†] and ^{††} indicate significant difference of the quantitative value compared with the jejunum ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively). [#] and ^{##} indicate significant difference of the quantitative value compared with the ileum ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively). [§] and ^{§§} indicate significant difference of the quantitative value compared with monkey ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively). [¶] and ^{¶¶} indicate significant difference of the quantitative value compared with human donor #1 ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively). [‡] and ^{‡‡} indicate significant difference of the quantitative value compared with human donor #2 ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively). ULQ represents under the limit of quantification (LQ) and the values of LQ were calculated according to the previous reports (Uchida et al., 2011b; Uchida et al., 2015) as described in the Experimental Section.

(1) Apical drug efflux transporters

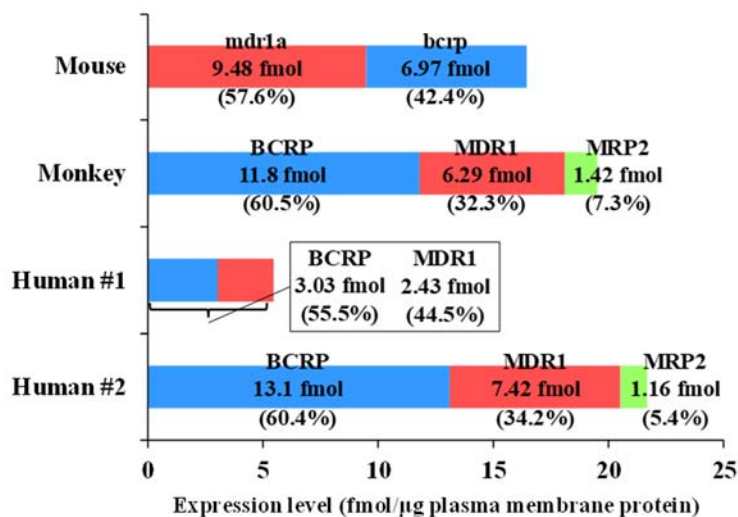
(A) Duodenum



(B) Jejunum

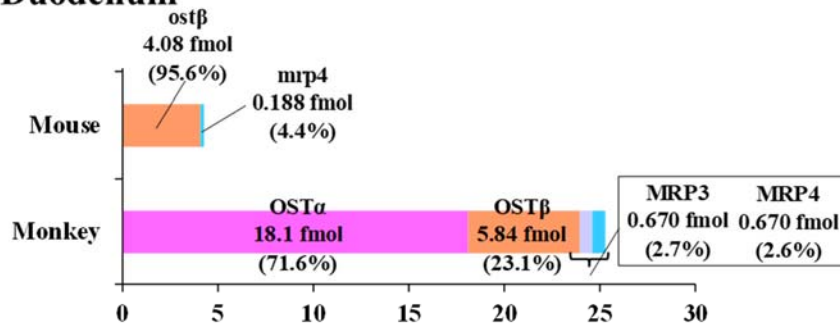


(C) Ileum

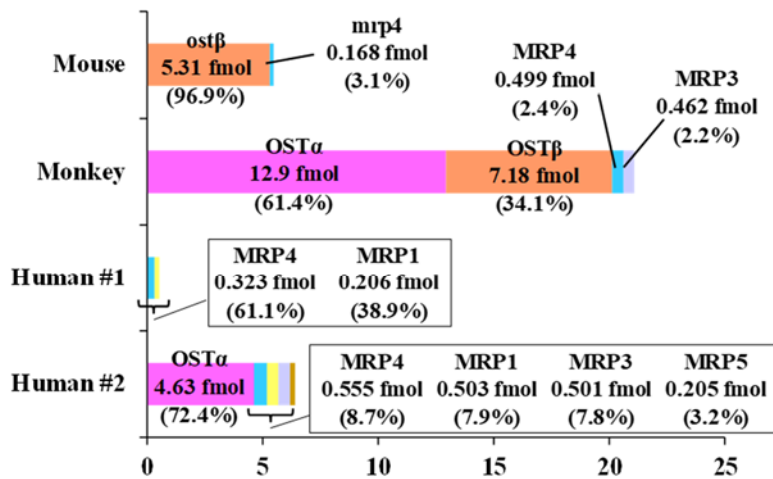


(2) Basolateral drug transporters

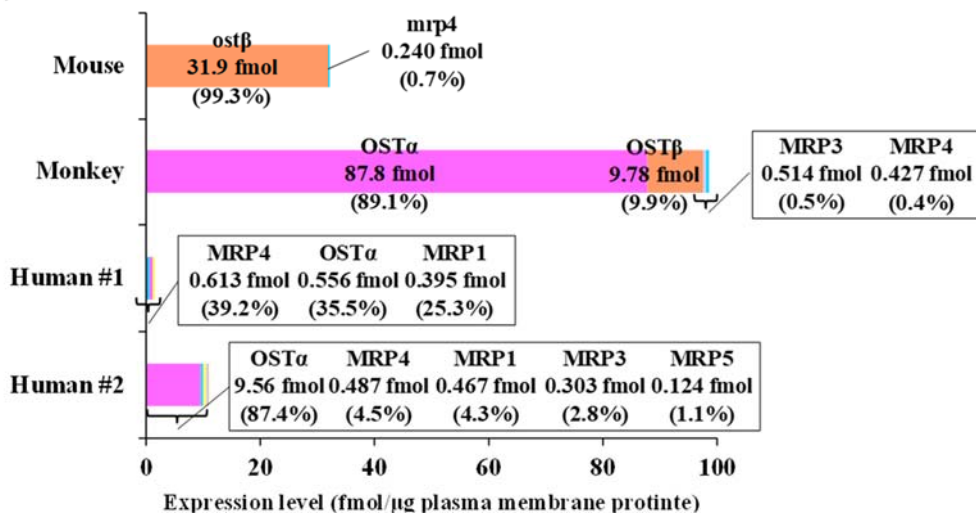
(A) Duodenum



(B) Jejunum

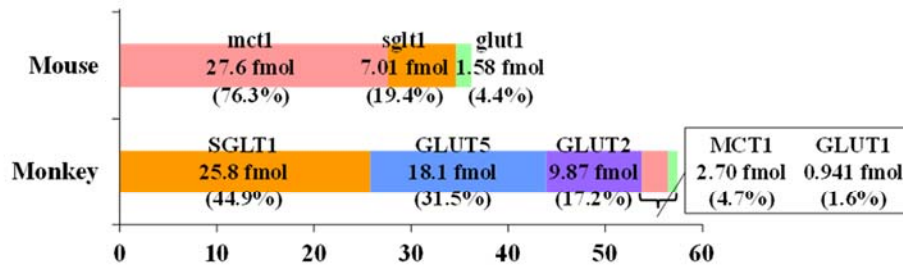


(C) Ileum

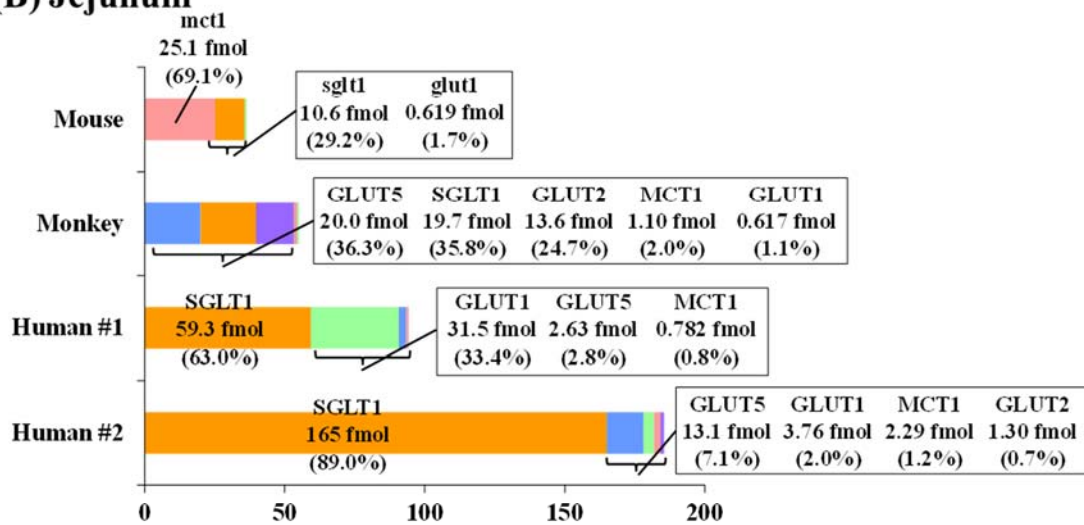


(3) Hexose / monocarboxylate transporters

(A) Duodenum



(B) Jejunum



(C) Ileum

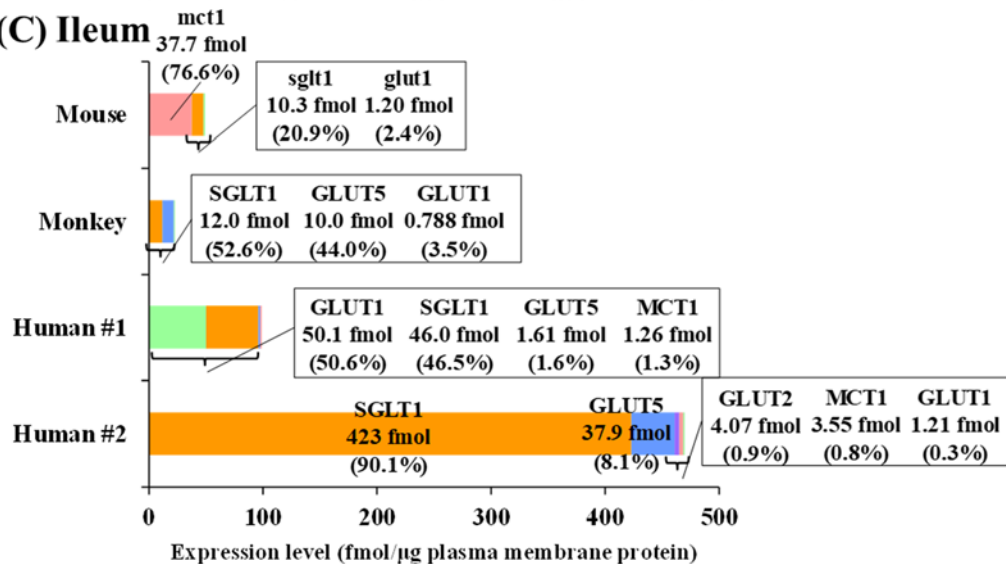


Figure 2-2. Relative protein expression levels of transporters in mouse, monkey, human donor #1, and #2 small intestine. Relative protein expression levels of transporters in cynomolgus monkey, human donor #1, #2, and ddY mouse small intestine. We categorized functionally similar proteins among quantifiable transporters into three groups; apical drug efflux transporters (BCRP/bcrp, P-gp/MDR1/mdr1a, and MRP2/mrp2) (1), basolateral drug transporters (OST α /ost α , OST β /ost β , MRP3/mrp3, MRP4/mrp4, MRP1/mrp1, and MRP5/mrp5) (2), and hexose / monocarboxylate transporters (SGLT1/splt1, GLUT5/glut5, GLUT2/glut2, GLUT1/glut1, and MCT1/mct1) (3). Then, we calculated relative protein expression level (%), which was expressed as percent of total transporter protein expression levels in each group. The data of protein expression levels were taken from Table 2-2. Nomenclature is given in capital letters for the human or monkey homolog, and lower-case letters for the mouse homolog. OST β in human and ost α , glut5, and glut2 in mouse were not measured in this study as described in Table 2-2. In monkey, MRP1, and MRP5 in all intestinal segments and GLUT2 and MCT1 in ileum were under limit of quantification as described in Table 2-2. In human, MRP2 in ileum of donor #2, OST α in jejunum, MRP3, MRP5, and GLUT2 in jejunum and ileum of donor #1 were under limit of quantification as described in Table 2-2. In mouse, mrp2, mrp1, and mrp5 in all intestinal segments were under limit of quantification as described in Table 2-2.

Table 2-4. Molecules Under the Limit of Quantification in Plasma Membrane Fractions of Isolated Epithelial Cells in Mouse Small Intestine

Molecule	LQ (fmol/μg plasma membrane protein)			Molecule	LQ (fmol/μg plasma membrane protein)		
	Duodenum	Jejunum	Ileum		Duodenum	Jejunum	Ileum
ABC transporter							
abca1	1.00	0.991	0.974	abcc2 / mrp2	0.185	0.190	0.209
abcb1 / mdr1b	1.39	1.40	1.37	abcc3 / mrp3	0.251	0.232	0.231
abcb4 / mdr2	0.102	0.103	0.103	abcc5 / mrp5	0.435	0.420	0.415
abcc1 / mrp1	0.122	0.117	0.0981	abcc6 / mrp6	0.541	0.532	0.531
SLC transporter							
slc6a6 / taut	0.139	0.165	0.172	slc21a14 / oatp14	0.126	0.122	0.123
slc7a5 / lat1	0.0355	0.0324	0.0391	slc21a17 / oatp17	0.151	0.138	0.138
slc10a2 / asbt	0.266	0.263	0.353	slc21a18 / oatp18	0.918	0.912	0.917
slc21a1 / oatp1	0.0936	0.0827	0.0782	slc22a2 / oct2	1.03	0.982	1.00
slc21a2 / pgt	0.390	0.387	0.387	slc22a3 / oct3	0.554	0.520	0.544
slc21a5 / oatp2	0.969	0.950	0.934	slc22a6 / oat1	0.0799	0.0714	0.0823
slc21a9 / oatp9	0.603	0.595	0.593	slc22a7 / oat2	0.910	0.849	0.879
slc21a10 / oatp4	0.361	0.360	0.363	slc22a8 / oat3	1.10	1.05	1.09
slc21a11 / oatp11	0.191	0.189	0.189	slc29a1 / ent1	0.500	0.495	0.488
slc21a12 / oatp12	0.289	0.286	0.287	slc47a1 / mate1	0.713	0.690	0.708
slc21a13 / oatp5	0.108	0.105	0.106	slc47a2 / mate2	0.0641	0.0626	0.0627

Molecules for which the protein expression levels in plasma membrane fractions of isolated small intestinal epithelial cells from ten ddY mice were under the limit of quantification (LQ) are listed. Abcb4 / mdr2 was quantified by Triple TOF 5600 and the other molecules were quantified by a triple quadrupole mass spectrometer. The values of LQ in quantification by a triple quadrupole mass spectrometer and Triple TOF 5600 were

calculated according to the previous reports (Uchida et al., 2011b; Uchida et al., 2015), respectively as described in the Experimental Section.

Table 2-5. Molecules Under the Limit of Quantification in Plasma Membrane Fractions of Isolated Epithelial Cells in Cynomolgus Monkey Small Intestine

Molecule	LQ (fmol/ μ g plasma membrane protein)		
	Duodenum	Jejunum	Ileum
ABC transporter			
ABCA1 / ABCA1	1.02	0.881	1.08
ABCC1 / MRP1	0.267	0.279	0.253
\S ABCC5 / MRP5	0.262	0.285	0.276
ABCG5 / ABCG5	0.331	0.313	0.398
SLC transporter			
\S SLC2A2 / GLUT2	(Detected)	(Detected)	2.52
\S SLC3A2 / 4F2hc	1.49	1.55	1.44
\S SLC10A2 / ASBT	0.294	0.297	0.329
\S SLC16A1 / MCT1	(detected)	(detected)	0.941
\S SLC21A2 / PGT	0.373	0.373	0.168
\S SLC21A3 / OATP1A2	0.439	0.455	0.503
\S SLC21A6 / OATP1B1	2.69	2.63	3.25
SLC21A8 / OATP1B3	0.194	0.196	0.188
\S SLC21A9 / OATP2B1	1.56	1.58	0.571
SLC21A11 / OATP3A1	0.622	0.424	0.428
\S SLC21A12 / OATP4A1	0.280	0.294	0.181
\S SLC21A14 / OATP1C1	0.301	0.148	0.163
\S SLC22A1 / OCT1	3.32	3.32	3.33
\S SLC22A2 / OCT2	0.430	0.439	0.451

§SLC22A3 / OCT3	0.264	0.277	0.200
§SLC22A4 / OCTN1	3.01	3.02	3.05
SLC22A5 / OCTN2	0.172	0.164	0.192
§SLC22A6 / OAT1	2.14	1.89	2.45
§SLC22A7 / OAT2	(Detected)	(Detected)	0.519
§SLC22A8 / OAT3	0.257	0.172	0.174
§SLC28A2 / CNT2	0.193	0.200	0.206
§SLC29A1 / ENT1	3.86	3.88	4.04
§SLC46A1 / PCFT	(Detected)	(Detected)	0.610
Others			
γ-GTP	2.19	0.333	0.419

Molecules for which the protein expression levels in plasma membrane fractions of isolated small intestinal epithelial cells from one cynomolgus were under the limit of quantification (LQ) are listed. The molecules marked with § were quantified by a Triple TOF 5600 and the other molecules were quantified by a triple quadrupole mass spectrometer (API5000 or Qtrap5500). The values of LQ in quantification by a triple quadrupole mass spectrometer and Triple TOF 5600 were calculated according to the previous reports (Uchida et al., 2011b; Uchida et al., 2015), respectively as described in the Experimental Section.

Table 2-6. Molecules Under the Limit of Quantification in Plasma Membrane Fractions of Isolated Epithelial Cells in Human Small Intestine

	LQ (fmol/ μ g plasma membrane protein)			
	Donor #1		Donor #2	
	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum
ABC transporter				
ABCB4 / MDR3	0.0931	0.0718	(Detected)	(Detected)
ABCC2 / MRP2	(Detected)	0.205	(Detected)	(Detected)
ABCC3 / MRP3	0.213	0.129	(Detected)	(Detected)
ABCC5 / MRP5	0.111	0.0629	(Detected)	(Detected)
ABCC6 / MRP6	0.0896	0.0796	(Detected)	(Detected)
SLC transporter				
SLC2A2 / GLUT2	0.967	1.01	(Detected)	(Detected)
SLC10A2 / ASBT	0.120	(Detected)	0.381	(Detected)
SLC15A2 / PEPT2	0.107	0.0881	(Detected)	(Detected)
SLC21A2 / PGT	0.146	0.126	0.319	0.318
SLC21A3 / OATP1A2	0.0912	0.0622	(Detected)	(Detected)
SLC21A8 / OATP1B3	0.0580	0.0507	(Detected)	(Detected)
SLC21A14 / OATP1C1	0.0403	0.0349	0.0863	0.0871
SLC21A20 / OATP4C1	1.77	1.37	1.36	1.67
SLC22A1 / OCT1	0.868	0.771	1.67	1.75
SLC22A2 / OCT2	0.563	0.449	0.555	0.672
SLC22A3 / OCT3	0.0112	0.0551	(Detected)	0.190
SLC22A6 / OAT1	0.950	0.813	2.11	1.48

SLC22A7 / OAT2	0.110	(Detected)	(Detected)	(Detected)
SLC22A8 / OAT3	0.0988	0.0850	(Detected)	0.168
SLC22A13 / OAT10	0.121	0.108	0.502	0.497
SLC22A18 / SLC22A18	0.727	0.719	(Detected)	(Detected)
SLC28A1 / CNT1	(Detected)	0.124	(Detected)	(Detected)
SLC28A2 / CNT2	(Detected)	0.0683	(Detected)	(Detected)
SLC29A1 / ENT1	(Detected)	(Detected)	1.56	(Detected)
SLC47A1 / MATE1	0.0703	0.0595	0.615	0.642
SLC47A2 / MATE2	0.0795	0.0673	0.248	0.246
SLC51A / OST α	0.557	(Detected)	(Detected)	(Detected)

Molecules for which the protein expression levels in plasma membrane fractions of isolated small intestinal epithelial cells from each human donor were under the limit of quantification (LQ) are listed. All molecules were quantified by a Triple TOF 5600. The values of LQ were calculated according to the previous report (Uchida et al., 2015) as described in the Experimental Section.

Table 2-7. Molecules Under the Limit of Quantification in Microsomal Membrane Fractions of Isolated Epithelial Cells in Cynomolgus Monkey Small Intestine

Molecule	LQ (fmol/μg microsomal membrane protein)		
	Duodenum	Jejunum	Ileum
CYPs			
CYP1A1	0.0542	0.548	0.574
CYP1A2	0.0535	0.0521	0.0523
CYP2B6	0.119	0.111	0.116
CYP2E1	0.176	0.189	0.183
UGTs			
UGT1A9	0.320	0.320	0.314

Molecules for which the protein expression levels in microsomal membrane fractions of isolated small intestinal epithelial cells from one cynomolgus monkey were under the limit of quantification (LQ) are listed. All molecules were quantified by a triple quadrupole mass spectrometer (API5000 or Qtrap5500). The values of LQ were calculated according to the previous report (Uchida et al., 2011b) as described in the Experimental Section.

Table 2-8. Molecules Under the Limit of Quantification in Microsomal Membrane Fractions of Isolated Epithelial Cells in Human Small Intestine

	LQ (fmol/μg microsomal membrane protein)			
	Donor #1		Donor #2	
	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum
CYP				
CYP1A1	0.134	0.131	0.129	0.131
CYP1A2	0.105	0.105	0.128	0.106
CYP1B1	0.544	0.548	0.548	0.551
CYP2A6	0.567	0.573	0.563	0.562
CYP2B6	0.157	0.157	0.156	0.166
CYP2C18	0.122	0.122	(Detected)	(Detected)
CYP2D6	0.140	0.139	(Detected)	(Detected)
CYP2E1	0.443	0.443	0.432	0.438
CYP2J2	4.15	(Detected)	(Detected)	(Detected)
CYP3A7	0.241	0.241	0.191	0.226
CYP3A43	0.113	0.112	0.112	0.114
CYP4A11	0.126	0.122	(Detected)	(Detected)
UGT				
UGT1A1	0.109	0.111	(Detected)	(Detected)
UGT1A4	0.118	0.122	0.119	0.125
UGT1A6	0.574	0.513	(Detected)	(Detected)
UGT2B4	0.0943	0.0960	0.0909	0.0933
UGT2B7	2.11	2.13	(Detected)	(Detected)

UGT2B15	0.364	0.375	0.317	0.341
Others				
P450R	9.14	4.86	(Detected)	(Detected)

Molecules for which the protein expression levels in microsomal membrane fractions of isolated small intestinal epithelial cells from each human donor were under the limit of quantification (LQ) are listed. All molecules were quantified by a Triple TOF 5600. The values of LQ were calculated according to the previous report (Uchida et al., 2015) as described in the Experimental Section.

Table 2-9. Range of Inter-individual Expression Differences in Human Jejunum

Molecule	Individual expression differences (max/min)	
	Our study	Miyauchi et al. (2016)
ABCB1 / MDR1 / P-gp	2.55	3.28
ABCB4 / MDR3	Not determined (donor #1)	Not determined
ABCC1 / MRP1	2.44	3.97
ABCC2 / MRP2	4.96	5.42
ABCC3 / MRP3	Not determined (donor #1)	7.10
ABCC4 / MRP4	1.72	7.23
ABCC5 / MRP5	Not determined (donor #1)	6.59
ABCC6 / MRP6	Not determined (donor #1)	4.59
ABCG2 / BCRP	2.07	5.28
ABCG8	6.31	3.85
SLC2A1 / GLUT1	8.38	Not measured
SLC2A2 / GLUT2	Not determined (donor #1)	2.97
SLC2A5 / GLUT5	4.98	3.14
SLC3A2 / 4F2hc	6.19	2.34
SLC5A1 / SGLT1	2.78	4.38
SLC6A6 / TAUT	2.77	2.73
SLC15A1 / PEPT1	3.67	5.32
SLC15A2 / PEPT2	Not determined (donor #1)	Not determined
SLC16A1 / MCT1	2.93	3.33
SLC21A3 / OATP1A2	Not determined (donor #1)	Not determined
SLC21A8 / OATP1B3	Not determined (donor #1)	Not determined

SLC22A7 / OAT2	Not determined (donor #1)	Not determined
SLC22A3 / OCT3	Not determined (donor #1)	Not determined
SLC22A8 / OAT3	Not determined (donor #1)	Not determined
SLC22A18	Not determined (donor #1)	8.22
SLC28A1 / CNT1	4.91	Not measured
SLC28A2 / CNT2	6.76	8.85
SLC29A1 / ENT1	Not determined (donor #2)	Not measured
SLC46A1 / PCFT	1.37	4.77
SLC51A / OST α	Not determined (donor #1)	2.76
villin-1	2.73	2.62
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	1.93	2.28
γ -GTP	1.21	Not measured
CYP2C9	7.38	5.92
CYP2C18	Not determined (donor #1)	3.42
CYP2D6	Not determined (donor #1)	7.16
CYP2J2	Not determined (donor #1)	6.27
CYP3A4	1.59	4.75
CYP4A11	Not determined (donor #1)	7.45
CYP51A1	1.84	3.75
UGT1A1	Not determined (donor #1)	3.38
UGT1A6	Not determined (donor #1)	5.23
UGT2B7	Not determined (donor #1)	5.41
UGT2B17	10.3	364
P450R	Not determined (donor #1)	2.51

The inter-individual expression ranges (max/min) in each study were calculated by dividing the maximum protein expression level by the minimum protein expression level for each molecule. The data of Miyauchi et al. (2016) was the protein quantification in jejuna of 24–28 morbidly obese human donors by LC-MS/MS, and taken from the previous report (Miyauchi et al., 2016).

第3節 考察

本研究によって、マウス、サル及びヒト小腸におけるトランスポーター及び代謝酵素のタンパク質発現量の種差が明らかとなった。代謝酵素の中ではUGT1A1及び1A6が最も顕著な種差が認められ、ヒトよりもサルの方が高発現していることが示された (Table 2-3)。また、空腸ではサル CYP3A8 の発現量はヒト CYP3A4 よりも高かった (Table 2-3)。さらに、頂端膜に発現する薬物排出トランスポーターの中では、サル及びヒト小腸ではいずれの部位でも BCRP が最大の発現を示したが、マウス小腸では対照的に *mdr1a* が *bcrp* よりも高発現していた (Table 2-2, Figure 2-2)。

UGT は、カルボン酸、ヒドロキシル基、チオール基及びアミノ基を有する化合物のグルクロン酸抱合代謝に関与し、buprenorphine 及び ezetimibe は UGT1A1 の基質、acetaminophen は UGT1A1 及び 1A6 の基質として知られている (Court et al., 2001; Furukawa et al., 2014)。Buprenorphine 及び ezetimibe の小腸ミクロソームにおける固有クリアランスは、ヒトよりもサルで 8.75 倍及び 17.2 倍高いことが報告されている (Furukawa et al., 2014)。また、acetaminophen の $F_a \times F_g$ 値はサルで 0.19、ヒトで 1 と報告されている (Takahashi et al., 2009)。これらのデータから、buprenorphine, ezetimibe 及び acetaminophen の小腸におけるグルクロン酸抱合代謝は、ヒトよりもサルの方が大きいことが示唆される。UGT 分子種は基質認識性が広く、buprenorphine は UGT1A3 及び 2B7, ezetimibe は UGT1A3 及び 2B15, acetaminophen は UGT1A1, 1A9, 2B7 及び 2B15 の複数の基質であることが報告されている (Court et al., 2001; Ritter, 2007; Furukawa et al., 2014)。従って、これまで UGT 基質は、小腸グルクロン酸抱合代謝活性からでは、どの分子種が小腸でのサルとヒト間の活性の種差に関与しているか特定するのは困難であった。本研究によって、UGT1A1 及び 1A6 はヒトよりもサルで空腸及び回腸のタンパク質発現量が高かったことから (Table 2-3), buprenorphine, ezetimibe 及び

acetaminophen の小腸におけるグルクロン酸抱合代謝のサルとヒト間の種差の一部を説明できると推察される。

CYP3A4 はヒト小腸に発現する CYP 分子種の中で最も発現が高いことが知られており (Paine et al., 2006; Groer et al., 2014; Miyauchi et al., 2016), 小腸吸収において CYP3A4 の基質はサルとヒト間で種差があることが報告されている (Nishimuta et al., 2010). Nishimuta らは CYP3A4 の基質 14 化合物について, サル及びヒト小腸ミクロソームにおける固有クリアランスを算出した結果, それらの値はヒトよりもサルで 2-4 倍高いことが報告している (Nishimuta et al., 2010). また, Akabane らは, CYP3A4 基質である dexamethasone, nifedipine, midazolam, quinidine 及び tacrolimus の $F_a \times F_g$ の値がサルの方がヒトよりも小さいことを報告している (Akabane et al., 2010). ヒト CYP3A4 に最もアミノ酸の相同性が高い分子種は, カニクイザルでは CYP3A8 (相同性; 93%) と報告されている (Iwasaki and Uno, 2009). 本研究では, 空腸でサル CYP3A8 がヒト CYP3A4 よりも 3.34 倍以上高発現しており (Table 2-3), CYP3A4 基質薬のサル-ヒト間の機能種差と一致する傾向だった. 一方, タンパク質発現量に加えて, ヒト CYP3A4 とサル CYP3A8 の単分子活性の差もサルとヒト間の種差に起因する可能性がある. Carr らはリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* 代謝試験によって, ヒト CYP3A4 とアカゲサル CYP3A64 の単分子活性を算出している (Carr et al., 2006). アカゲザル CYP3A64 は, カニクイザル CYP3A8 とアミノ酸配列が全く同じであるため, アカゲザル CYP3A64 の単分子活性はカニクイザル CYP3A8 と等しいと考えられる. 彼らの報告によれば, CYP3A4 基質の midazolam 及び nifedipine の単分子活性は, アカゲザル CYP3A64 (カニクイザル CYP3A8) でヒト CYP3A4 よりも 1.7 倍及び 2.0 倍高いことが示されている (Carr et al., 2006). Midazolam 及び nifedipine の $F_a \times F_g$ の値はヒトよりもサルで 15.0 倍及び 4.68 倍低いと報告されているが, サル CYP3A8 とヒト CYP3A4 の空腸でのタンパク質発現量の差は 3.34

倍以上サルの方がヒトよりも高いという本研究結果だけでは、 $Fa \times Fg$ 値のサルとヒト間の種差を完全には説明できない。従って、サルとヒト間の CYP3A4 基質の小腸吸収の種差は CYP3A 分子種のタンパク質発現量及び単分子活性の種差の双方が寄与している可能性が推察される。

BCRP 及び P-gp は種々の薬物の小腸吸収を制限しており、BCRP 及び P-gp の阻害剤と併用した場合にこれらの基質薬の小腸吸収性が上昇することがヒト臨床で報告されている(Simpson and Jarvis, 2000; Tapaninen et al., 2011; Delavenne et al., 2012; Kusuvara et al., 2012)。本研究では、サル及びヒト小腸では P-gp よりも BCRP が高発現だったが、対照的にマウスでは *bcrp* よりも *mdr1a* の方が高発現だった (Table 2-2, Figure 2-2)。P-gp と BCRP は共通の基質が多数存在することが知られているが (Kodaira et al., 2011; Poirier et al., 2014)、両者の共通の基質の場合、併用薬によって BCRP が阻害された場合には、マウスよりもサル及びヒトで消化管吸収に対する薬物間相互作用の影響が大きくなる可能性が推察される。

BCRP の発現量を動物種間または動物とヒト間で比較すると、サルとヒト間の比較では、回腸では種差が認められなかったが、空腸ではヒトよりもサルの方が高かった (Table 2-2)。一方、サルとマウス間の比較では、十二指腸、空腸及び回腸のいずれにおいても、サルの方がマウスよりも高かった (Table 2-2)。従って本結果から、少なくともサルでは、マウス及びヒトよりも消化管吸収性に対する BCRP の影響が大きい可能性が推察される。実際に、サル、マウス及びヒトにおいて、BCRP の選択的な基質である sulfasalazine の BA はそれぞれ 2.75%, 5.27% 及び 8%と、サルの方がマウス及びヒトよりも低いことが示されており (Varma et al., 2010; Karibe et al., 2015)、サルとマウス及びヒト間の小腸 BCRP のタンパク質発現量の違いが sulfasalazine の経口吸収性の種差に一部起因している可能性が推察される。

P-gp の絶対発現量については、サルとヒト間では空腸及び回腸のいずれも種差が認められなかったが、マウス *mdr1a* はヒト P-gp よりも空腸及び回腸のいずれにおいても高発現だった (Table 2-2). P-gp の基質である fexofenadine について、P-gp 阻害剤の ketoconazole 併用時の AUC の上昇度は、サル及びヒトではいずれも 2.6 倍だが、マウスでは、fexofenadine 経口投与時の *mdr1a* KO マウスの血漿中濃度が野生型マウスと比較して 4.6 倍高いことが報告されている (Cvetkovic et al., 1999; Simpson and Jarvis, 2000; Ogasawara et al., 2007). この結果は、サル及びヒトよりもマウスの方が小腸吸収に対する P-gp の影響が強いことを示唆しており、本研究によってそれは P-gp/*mdr1a* のタンパク質発現量の種差が一因となる可能性が推察された.

OST α 及び OST β は、2 量体を形成することで輸送機能を示すトランスポーターであるが (Seward et al., 2003), 本研究では、定量可能なペプチドを設計できなかったため、ヒトでは OST α , マウスでは OST β のみ定量を行った. サル小腸では OST α 及び β の発現が MRP3 及び 4 よりも高く、マウス十二指腸、空腸及び回腸でも同様に OST β が *mrp4* よりも高発現していた (Table 2-2, Figure 2-2). ヒトにおいては、両ドナー間で MRP 分子種と OST α の発現量の大小関係に個人差が認められ、ドナー#2 では、サルやマウスと同様に、空腸及び回腸でいずれも MRP1, 3, 4 及び 5 よりも高発現していたが、ドナー#1 では回腸では MRP4 と OST α が同程度の発現量を示した (Table 2-2, Figure 2-2). ドナー#1 の空腸では OST α が定量限界以下であったが、その定量下限値 (<0.557 fmol/ μ g plasma membrane protein) が、MRP 分子種の中で最も高発現の MRP4 の発現量 (0.323 fmol/ μ g plasma membrane protein) 以上であるため、OST α と MRP4 の大小関係は不明である (Tables 2-2, 2-6, Figure 2-2). OST α/β は、digoxin を輸送基質とすること、また、indomethacin sulfobromophthalein, probenecid 及び spironolactone のような複数のアニオン系薬物によって、基質である estrone 3-sulfate の輸送が阻害さ

れることが報告されている (Seward et al., 2003). 従って, OST α/β はアニオン系薬物を基質とする可能性を有しており, 小腸でのアニオン系薬物の消化管吸収において, OST α/β が重要な働きを担っている可能性が推察される.

OATPs は, fexofenadine 及び talinolol のような有機アニオン系薬物の消化管吸収に関与する取り込みトランスポーターであるが (Tamai, 2012), 本研究では human ドナー#2 で OATP1A2 及び 1B3 の発現が認められた (Table 2-2). OATP1A2 は, 免疫染色法によって小腸の頂端膜に発現していることが報告されている (Glaeser et al., 2007). 一方で, Gröer らは, ヒト小腸ミクロソーム膜画分を測定サンプルとして, 本研究と同一の定量ペプチドを使用し OATP1A2 のタンパク質発現量解析を行っているが, OATP1A2 のタンパク質発現は認められなかった (Groer et al., 2013). しかし, 本研究ではミクロソーム膜画分よりも濃縮された細胞膜画分を測定サンプルとして使用しているため, 本研究でのみ OATP1A2 の発現が検出できた可能性が考えられる. また, OATP1B3 はヒト小腸において過去に遺伝子レベルでの発現が報告されているが (Glaeser et al., 2007), 本研究ではタンパク質レベルでも発現していることが確認された. しかし, Miyauchi らの LC-MS/MS を用いたタンパク質定量解析によれば, OATP1A2 及び 1B3 に関しては細胞膜画分においても発現が認められなかった (Miyauchi et al., 2016). しかし, 彼らが定量に使用したペプチドは本研究のものとは配列が異なっており, リジルエンドペプチダーゼ及びトリプシンの消化効率やペプチドの定量感度の違いで, 本研究と彼らとでは異なる結果になった可能性が考えられる.

グルコース及び酪酸, 乳酸, ピルビン酸等の短鎖脂肪酸は, 生命活動を維持する上で重要なエネルギー源である. サル及びヒト小腸の頂端膜では, グルコースの取り込みトランスポーターである SGLT1 及び GLUT5 が MCT1 よりも高発現しており (Table 2-2, Figure 2-2), 既報のヒト小腸における LC-MS/MS を用いたタンパク質定量においても同様の結果だった (Miyauchi et al., 2016). 対照的にマ

ウスでは SGLT1 よりも短鎖脂肪酸の取り込みトランスポーターである MCT1 が高発現していた (Table 2-2, Figure 2-2). 食物繊維は、腸内細菌によって酪酸、乳酸及びピルビン酸等の短鎖脂肪酸に分解されるが、マウスではヒトよりも腸内細菌が小腸に多く存在していることが報告されており (Kararli, 1995), 短鎖脂肪酸が生成されやすい環境であることが推察される. 従って、マウスで MCT1 が高発現していることは、短鎖脂肪酸を効率よく吸収する点で理想的な吸収機構であると考えられる.

小腸におけるトランスポーター及び代謝酵素の発現に部位差がある場合、薬物が吸収される部位によってそれらの影響が異なると考えられることから、それらのタンパク質発現量の部位差を明らかにすることは重要である. これまでトランスポーター、CYP 及び UGT に関してヒト小腸で LC-MS/MS を用いたタンパク質定量が行われてきたが、本研究では、初めて同一ドナー間で空腸及び回腸における発現部位差を解析した. マウス及びサルにおいては、P-gp/mdr1a の発現が上部よりも下部の方が高かった (Table 2-2). 既報では、排出活性についてもマウス及びサルにおいては上部よりも下部の方が高いことが報告されており (Stephens et al., 2002; Nishimura et al., 2008), 本研究のタンパク質発現量の部位差と一致する結果であった. 本研究では、ヒトにおいても同様に空腸よりも回腸で発現が高く、P-gp/mdr1a の部位差に関してはマウス、サル及びヒト間で同様の傾向であった (Table 2-2). また、BCRP に関しては、マウス及びヒトで上部から下部にかけて発現が増大していた (Table 2-2). これまでサルでは部位差の報告例はないが、マウスでは上部から下部にかけてタンパク質発現及び輸送活性が増大することが報告されている (Enokizono et al., 2007). 本研究でもマウスに関しては一致した結果となり、下部でタンパク質発現量が高いサルにおいても同様に輸送活性が下部で高くなると推察される. 一方、ヒトにおいては空腸と回腸で BCRP のタンパク質発現量に顕著な差は認められなかった. 従って、ヒトでは

BCRP の機能的部位差はマウス及びサルに比べて小さい可能性が推察される。さらに、サル CYP3A8 及びヒト CYP3A4 に関しても部位差が認められた。サル CYP3A8 は回腸よりも十二指腸及び空腸で発現が高かった (Table 2-3)。サル小腸ミクロソームにおける CYP3A 基質の代謝活性は下部よりも上部で高いことが報告されており (Nakanishi et al., 2011; Yoda et al., 2012), 本研究の CYP3A8 の発現分布と一致する傾向であった。一方、ヒトにおいては本研究では両ドナーとも空腸よりも回腸の方で発現が高かった (Table 2-3)。既報では CYP3A4 のタンパク質発現及び活性は回腸よりも空腸で高いことが報告されており (Zhang et al., 1999; Paine et al., 1997), 本研究と反する結果となった。しかし Paine らは, CYP3A4 の活性が最も高い部位は、ドナーによって異なることを示している (Paine et al., 1997)。従って、本研究の結果から考察すると、ヒト CYP3A4 の発現パターンはマウスやサルとは異なる可能性が考えられるが、ヒトの個人差による影響も完全には無視できないだろう。

本研究では、ヒト 2 検体における発現量解析を行ったが、両ドナーのタンパク質発現量に個人差が生じている。そこで、本研究における個人差が妥当な範囲内であるか確かめるために、過去の研究で行われた複数のヒト検体を用いた小腸のトランスポーター代謝酵素のタンパク質発現または活性解析における個人差と比較した。Miyauchi らは、24-28 人の肥満患者の空腸について、本研究と同様に細胞膜画分でトランスポーターを、ミクロソーム膜画分で CYP 及び UGT を LC-MS/MS を用いてタンパク質発現量を測定している (Miyauchi et al., 2016)。本研究でのドナー#1 及び#2 のトランスポーター、CYP 及び UGT の発現量のドナー間差を Miyauchi らのものと比較した。本研究で両ドナーとも定量できた 20 分子 (P-gp, MRP1, MRP2, MRP4, BCRP, ABCG8, GLUT5, 4F2hc, SGLT1, TAUT, PEPT1, MCT1, CNT2, PCFT, villin-1, Na⁺/K⁺-ATPase, CYP3A4, CYP2C9, CYP51A1 及び UGT2B17) のうち、14 分子 (P-gp, MRP1, MRP2, MRP4, BCRP, SGLT1,

PEPT1, MCT1, CNT2, PCFT, Na⁺/K⁺-ATPase, CYP3A4, CYP51A1 及び UGT2B17) に関しては、本研究のドナー間差が、Miyauchi らが示したドナー間差よりも小さく、残りの 6 分子 (ABCG8, GLUT5, 4F2hc, TAUT, villin-1 及び CYP2C9) に関しては Miyauchi らのドナー間差よりも大きかった (Table 2-9). 従って、これら 14 分子に関しては、本研究で示すドナー間差が妥当な範囲内であることを示唆している. また一方で残りの 6 分子に関しては、彼らのヒト検体は肥満患者から得られたものであるため、疾患による発現変動の可能性もあるかもしれない. Paine らは、31 ドナーに関して定量ウエスタンブロット法で CYP2C9 及び 3A4 のタンパク質発現量を測定しているが、それらの個人差は最大 9.3 倍及び 17.0 倍だった (Paine et al., 2006). また、Obach らは 10 ドナーの小腸ミクロソームを用いて CYP2C9 及び 3A4 の代謝活性を測定しているが、その個人差は空腸で最大 17.7 倍及び 6.8 倍だった (Obach et al., 2001). 本研究では、CYP2C9 及び 3A4 のタンパク質発現量のドナー間差は、空腸でそれぞれ最大 7.38 倍及び 1.59 倍、回腸でそれぞれ最大 4.47 倍及び 1.60 倍であり、既報の個人差よりも小さかった (Table 2-3). 加えて、本研究ではドナー#1 で UGT1A1, 1A6 及び 2B7 が定量限界以下だったが、Strassburg らの遺伝子発現解析においても、一部のドナーではこれらの分子が発現していなかった (Strassburg et al., 2000). 以上の結果から、本研究におけるヒト 2 検体における個人差は妥当な範囲内であることが示唆される. しかし、マウス、サル及びヒトのトランスポーター及び代謝酵素のタンパク質発現量の種差についてさらに明白にするためには、サル及びヒトについて性別や年齢、病気の背景等の様々な要因の層別化解析を含む、大規模なサンプル解析が将来必要である.

結論として、本研究ではマウス、サル及びヒト小腸についてトランスポーター、CYP 及び UGT のタンパク質発現量を網羅的に解析し、それらの種差を明らかにした. これらトランスポーター及び代謝酵素のタンパク質発現量の種差の情報

は、マウス、サル及びヒト小腸における個々の機能的種差を推定する上で有用である。中でも、UGT1A1 及び 1A6 に関しては、これまで UGT 分子種は基質特異性の広さを理由に UGT 基質を用いた抱合代謝試験からではどの分子種が種差に起因するか特定することは困難であったが、本研究によって、UGT1A1 及び 1A6 を介した抱合代謝は、ヒトよりもサルの方が大きくなる可能性が示唆された。

第3章 マウス小腸における P-gp/mdr1a 輸送活性の再構築

第1節 序論

Uchida らは、マウス、サル及び病態モデルマウスの BBB における P-gp/mdr1a の輸送活性について、P-gp/mdr1a 安定発現株を用いた輸送試験における輸送活性を、P-gp/mdr1a 安定発現株と BBB のタンパク質発現量比で外挿することで再構築することに成功している (Uchida et al., 2011a; Uchida et al., 2014a; Uchida et al., 2014b). 従って、小腸の P-gp/mdr1a の輸送活性についても、BBB での再構築の手法を参考にすることで、P-gp/mdr1a 安定発現株における輸送活性から再構築できる可能性がある.

P-gp/mdr1a の再構築の手法の原理は、in vivo と in vitro 試験系の単位タンパク質あたりの輸送活性が等しいという仮定に基づき、in vitro 試験系で算出した輸送活性を in vivo と in vitro 試験系における P-gp/mdr1a のタンパク質発現量比で外挿することで in vivo における輸送活性が再構築されるというものである. P-gp/mdr1a が機能する場は細胞膜であるため、in vitro 試験系における輸送活性を in vivo に外挿するために用いる P-gp/mdr1a タンパク質発現量は細胞膜における値が相応しいと考えられる. 前述の Uchida らが行った BBB の再構築では、全細胞抽出液における P-gp/mdr1a のタンパク質発現量を用いている (Uchida et al., 2011a; Uchida et al., 2014a; Uchida et al., 2014b). しかし BBB の実体である脳毛細血管内皮細胞は微絨毛構造が存在せず、同様に P-gp/mdr1a 安定細胞株 (ブタ腎臓近位尿細管上皮細胞由来細胞株 LLC-PK1 細胞を親細胞とした P-gp/mdr1a 安定発現株) では微絨毛構造が発達していないことが報告されている (Gstraunthaler et al., 1985). そのため、単位細胞あたりに含まれる細胞膜量は in vivo と in vitro ではほぼ等しいと考えられるため、全細胞抽出液における発現量を用いても再構築が可能と推察される. 一方、小腸は微絨毛が発達しているため (Mayhew and Middleton, 1985), 単位細胞あたりに含まれる細胞膜量が in vivo と

in vitro で異なると考えられる。そこで小腸における P-gp/mdr1a 輸送活性の再構築では, in vitro 試験系における P-gp/mdr1a 輸送活性を外挿するための P-gp/mdr1a 発現量は, 全細胞抽出液ではなく細胞膜画分における値を用いる必要があると考えた。

小腸における P-gp/mdr1a の輸送活性を in vitro 試験系における輸送活性から再構築が行えるか検証するにあたって, 使用するモデル基質の選択が重要である。本検証で使用する in vivo における P-gp/mdr1a の輸送活性は, 遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析から算出されるが, 用いる基質薬が複数のトランスポーターの基質になる場合, ノックアウトした遺伝子以外のトランスポーターの影響によって, ノックアウトした目的遺伝子の輸送活性が見かけ上過小評価される場合がある (Kitamura et al., 2008; van Waterschoot et al., 2010; de Waart et al., 2012)。そのため, 本検証に使用するモデル基質は, 小腸に発現する他のトランスポーターの影響を受けない P-gp/mdr1a に選択的な基質であることが重要である。一部の P-gp 基質は BCRP 等のトランスポーターの基質にもなることが報告されているが (Kodaira et al., 2011; Poirier et al., 2014), Adachi らが実施した in situ マウス小腸灌流試験で使用された P-gp 基質薬の in situPS product ratio (in situPS_a to b ratio) は, P-gp 安定発現株を用いた経細胞輸送試験における in vitroPS_a to b ratio と複数の化合物間で相関していることから, 彼らの検証で使用した P-gp 基質薬は, 少なくとも小腸では他のトランスポーターによる輸送の影響を受けない比較的选择的な基質であると考えられる (Adachi et al., 2003)。そこで, マウス mdr1a をモデルとし, さらに Adachi らが使用した mdr1a 基質 6 化合物 (quinidine, digoxin, loperamide, vinblastine, verapamil 及び dexamethasone) 及び非基質薬 1 化合物 (diazepam) を使用することで, 再構築の手法が小腸吸収に適応できるか検討可能と考えた。

本実験では, マウス小腸における mdr1a の輸送活性は, 過去に Adachi らが報

告した *in situ* 空腸灌流試験での野生型マウスに対する *mdr1a* (-/-) マウスの頂端膜から基底側膜方向の小腸透過性の比 (*in situ*PS_{a to b} ratio) を使用した (Adachi et al., 2003). *in vitro* 試験における *mdr1a* 輸送活性は, 過去に東北大学大学院 薬学研究科 薬物送達学分野 内田 康雄 博士らが行った輸送実験の報告値 (Uchida et al., 2011a) を引用し, その値を用いてマウス *mdr1a* 安定発現株 (L-*mdr1a* 細胞) に対する親株 (LLC-PK1 細胞) の頂端膜から基底側膜方向の膜透過性の比 (*in vitro*PS_{a to b} ratio) を算出した. 本研究では, 薬物速度論に従い, 上述の *in vitro* 試験における輸送活性 (*in vitro*PS_{a to b} ratio) を本実験で測定した L-*mdr1a* 細胞及びマウス空腸の細胞膜画分における *mdr1a* タンパク質発現量比で外挿することで, マウス小腸における *mdr1a* 輸送活性 (*in situ*PS_{a to b} ratio) を再構築できるか検証することを目的とした.

第2節 再構築理論

Subsection 1; $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b}$ ratio 及び $\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b}$ ratio の定義

本実験では、 $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b}$ をマウス小腸上皮細胞の頂端膜から基底側膜方向の膜透過係数と小腸上皮細胞膜 1 μg に相当する小腸上皮細胞膜の表面積の積と定義した。また同様に、 $\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b}$ をマウス *mdr1a* 安定発現株 (*L-mdr1a* 細胞) または親細胞 (*LLC-PK1* 細胞) の頂端膜から基底側膜方向の膜透過係数と *L-mdr1a* 細胞または *LLC-PK1* 細胞の細胞膜 1 μg に相当する小腸上皮細胞膜の表面積の積と定義した。

マウス小腸における *mdr1a* 輸送活性は、Adachi らが報告した薬物速度論モデル (Scheme 3-1) (Adachi et al., 2003) に従い、次式で表される野生型マウスに対する *mdr1a/1b* (-/-) マウスの $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b}$ の比 ($\text{in situ PS}_{a \text{ to } b}$ ratio) から算出される。

$$\text{in situ PS}_{a \text{ to } b} \text{ ratio} = \frac{\text{in situ PS}_{a \text{ to } b} \text{ in } mdr1a/1b (-/-)}{\text{in situ PS}_{a \text{ to } b} \text{ in WT}} = 1 + \frac{\text{in situ PS}_{mdr1a}}{\text{in situ PS}_{a, \text{eff}} + \text{in situ PS}_{b, \text{eff}}} \quad (\text{Eq. 3-1})$$

ここで、 $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b} \text{ in } mdr1a/1b (-/-)$ ($\mu\text{L}/\text{min}/\mu\text{g}$ plasma membrane protein) 及び $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b} \text{ in WT}$ ($\mu\text{L}/\text{min}/\mu\text{g}$ plasma membrane protein) は、それぞれ *mdr1a/1b* (-/-) マウス及び野生型マウス小腸における頂端膜から基底側膜方向の PS product を表す。 $\text{in situ PS}_{mdr1a}$ ($\mu\text{L}/\text{min}/\mu\text{g}$ plasma membrane protein) 及び $\text{in situ PS}_{a, \text{eff}}$ ($\mu\text{L}/\text{min}/\mu\text{g}$ plasma membrane protein) は、それぞれ頂端膜における *mdr1a* の排出輸送クリアランス及び *mdr1a* 以外の総排出クリアランスを表す。 $\text{in situ PS}_{b, \text{eff}}$ ($\mu\text{L}/\text{min}/\mu\text{g}$ plasma membrane protein) は、基底側膜における排出クリアランスを表す。

同様の理論で、*L-mdr1a* 細胞に対する *LLC-PK1* 細胞の $\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b}$ の比 ($\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b}$ ratio) は、次式で表される。

$$\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b} \text{ ratio} = \frac{\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b} \text{ in LLC-PK1}}{\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b} \text{ in L-mdr1a}} = 1 + \frac{\text{in vitro PS}_{\text{mdr1a}}}{\text{in vitro PS}_{a, \text{eff}} + \text{in vitro PS}_{b, \text{eff}}} \quad (\text{Eq. 3-2})$$

ここで, $\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b} \text{ in LLC-PK1}$ ($\mu\text{L}/\text{min}/\mu\text{g}$ plasma membrane protein) 及び $\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b} \text{ in L-mdr1a}$ ($\mu\text{L}/\text{min}/\mu\text{g}$ plasma membrane protein) は, それぞれ LLC-PK1 細胞及び L-mdr1a 細胞における頂端膜から基底側膜方向の PS product を表す. $\text{in vitro PS}_{\text{mdr1a}}$ 及び $\text{in vitro PS}_{a, \text{eff}}$ は, それぞれ頂端膜における mdr1a の排出輸送クリアランス及び mdr1a 以外の総排出クリアランスを表す. $\text{in vitro PS}_{b, \text{eff}}$ は, 基底側膜における排出クリアランスを表す.

Subsection 2; $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b} \text{ ratio}$ と $\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b} \text{ ratio}$ の統合

ここでは, Eq. 3-1 と Eq. 3-2 を統合することで, $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b} \text{ ratio}$ について単層膜細胞を用いた in vitro 膜透過試験で算出可能な $\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b} \text{ ratio}$ から再構築するための理論を示す. 評価化合物について, mdr1a を介した排出輸送以外は, 受動拡散でそれぞれの膜を透過すると仮定すると, Eq. 3-3 が得られる. なお, Eq. 3-3 の算出過程は Subsection 3 で示す.

$$\text{in situ PS}_{a, \text{eff}} + \text{in situ PS}_{b, \text{eff}} = \text{in vitro PS}_{a, \text{eff}} + \text{in vitro PS}_{b, \text{eff}} \quad (\text{Eq. 3-3})$$

Eq. 3-3 を用いることで, Eq. 3-1 と Eq. 3-2 は次式のように統合できる.

$$\text{in situ PS}_{a \text{ to } b} \text{ ratio} = 1 + (\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b} \text{ ratio} - 1) \times \frac{\text{in situ PS}_{\text{mdr1a}}}{\text{in vitro PS}_{\text{mdr1a}}} \quad (\text{Eq. 3-4})$$

既報では, ヒト小腸及び強制発現細胞において, ヒト MDR1 の排出活性はタ

ンパク質発現量と比例することが報告されている (Hoffmeyer et al., 2000; Shirasaka et al., 2008). 従って, マウス小腸と L-mdr1a 細胞で mdr1a の単分子活性 (単位タンパクあたりの輸送活性) が変わらないと仮定すると, in situ と in vitro 試験系の mdr1a 排出活性比は, それらのタンパク質発現量比と等しくなり, Eq. 3-5 が得られる.

$$\frac{\text{in situ PS}_{\text{mdr1a}}}{\text{in vitro PS}_{\text{mdr1a}}} = \frac{\text{in situ A}_{\text{mdr1a}}}{\text{in vitro A}_{\text{mdr1a}}} \quad (\text{Eq. 3-5})$$

なお, in situ A_{mdr1a} (fmol/μg plasma membrane protein) 及び in vitro A_{mdr1a} (fmol/μg plasma membrane protein) は, それぞれマウス小腸及び L-mdr1a 細胞の細胞膜 1 μg あたりにおける mdr1a タンパク質発現量を示す.

従って, Eq. 3-4 及び Eq. 3-5 から in situ PS_{a to b} ratio は次式のように変形でき, in vitro PS_{a to b} ratio とマウス小腸及び L-mdr1a 細胞における mdr1a タンパク質発現量によって再構築できる式が導かれる.

$$\text{in situ PS}_{\text{a to b ratio}} = 1 + (\text{in vitro PS}_{\text{a to b ratio}} - 1) \times \frac{\text{in situ A}_{\text{mdr1a}}}{\text{in vitro A}_{\text{mdr1a}}} \quad (\text{Eq. 3-6})$$

Subsection 3; Eq. 3-3 の導入過程

ここでは, Subsection 2 で示した Eq. 3-3 の妥当性について議論する. 評価化合物が mdr1a を介した排出輸送以外は, 受動拡散でそれぞれの膜を透過すると仮定すると次式が得られる.

$$\text{in situ P}_{\text{a, eff}} = \text{in situ P}_{\text{b, eff}} = \text{in vitro P}_{\text{a, eff}} = \text{in vitro P}_{\text{b, eff}} = P_{\text{passive}} \quad (\text{Eq. 3-7})$$

なお, $\text{in situ}P_{a, \text{eff}}$ ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{cm}^2$) 及び $\text{in vitro}P_{a, \text{eff}}$ ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{cm}^2$) は, それぞれマウス小腸及び in vitro 細胞単層膜の頂端膜における mdr1a 以外の総排出膜透過係数を表し, $\text{in situ}P_{b, \text{eff}}$ ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{cm}^2$) 及び $\text{in vitro}P_{b, \text{eff}}$ ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{cm}^2$) は, それぞれマウス小腸及び in vitro 細胞単層膜の基底側膜における mdr1a 以外の総排出膜透過係数を表す.

さらに, PS product は各細胞膜における膜透過係数とその膜表面積の積で定義されるため, Eq. 3-3 の左辺は以下のように変換できる.

$$\begin{aligned}
 & \text{in situ}PS_{a, \text{eff}} + \text{in situ}PS_{b, \text{eff}} \\
 &= (\% \text{ of in situ}AM \times \text{in situ}SA_{\text{total}}) \times \text{in situ}P_{a, \text{eff}} \\
 & \quad + (\% \text{ of in situ}BM \times \text{in situ}SA_{\text{total}}) \times \text{in situ}P_{b, \text{eff}} \\
 &= (\% \text{ of in situ}AM + \% \text{ of in situ}BM) \times \text{in situ}SA_{\text{total}} \times P_{\text{passive}} \\
 &= \text{in situ}SA_{\text{total}} \times P_{\text{passive}} \tag{Eq. 3-8}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 & \text{in vitro}PS_{a, \text{eff}} + \text{in vitro}PS_{b, \text{eff}} \\
 &= (\% \text{ of in vitro}AM \times \text{in vitro}SA_{\text{total}}) \times \text{in vitro}P_{a, \text{eff}} \\
 & \quad + (\% \text{ of in vitro}BM \times \text{in vitro}SA_{\text{total}}) \times \text{in vitro}P_{b, \text{eff}} \\
 &= (\% \text{ of in vitro}AM + \% \text{ of in vitro}BM) \times \text{in vitro}SA_{\text{total}} \times P_{\text{passive}} \\
 &= \text{in vitro}SA_{\text{total}} \times P_{\text{passive}} \tag{Eq. 3-9}
 \end{aligned}$$

$\text{in situ}SA_{\text{total}}$ ($\text{cm}^2/\mu\text{g}$ plasma membrane protein) 及び $\text{in vitro}SA_{\text{total}}$ ($\text{cm}^2/\mu\text{g}$ plasma membrane protein) は, それぞれマウス小腸及び in vitro 細胞単層膜の頂端膜と基底側膜を合わせた全細胞膜 1 μg あたりの表面積を表す. $\% \text{ of in situ}AM$ 及び $\% \text{ of in situ}BM$ は, マウス小腸の全細胞膜を構成する頂端膜及び基底側膜の割合を表し ($\% \text{ of in situ}AM + \% \text{ of in situ}BM = 1$), $\% \text{ of in vitro}AM$ 及び $\% \text{ of in vitro}BM$ は, in vitro 細

胞単層膜の全細胞膜を構成する頂端膜及び基底側膜の割合を表す (% of *in vitro*AM + % of *in vitro*BM = 1).

全細胞膜 1 μg あたりの表面積は、マウス小腸と *in vitro* 細胞単層膜で等しいと仮定すると、次式が得られる.

$$\text{in situSA}_{\text{total}} = \text{in vitroSA}_{\text{total}} \quad (\text{Eq. 3-10})$$

Eq. 3-10 に従えば、Eq. 3-8 及び Eq. 3-9 の右辺は等しくなり、Eq. 3-3 が得られる.

Subsection 4; Eq. 3-5 の導入過程

ここでは、Subsection 2 で示した Eq. 3-5 の妥当性について議論する. まず、mdr1a は小腸及び *in vitro* 細胞単層膜の頂端膜に発現するため、mdr1a の排出輸送クリアランス (PS_{mdr1a}) は mdr1a を介した排出輸送の透過係数と頂端膜の表面積の積で表される. 従って、次式が得られる.

$$\text{in situPS}_{\text{mdr1a}} = (\% \text{ of in situAM} \times \text{in situSA}_{\text{total}}) \times \text{in situP}_{\text{mdr1a}} \quad (\text{Eq. 3-11})$$

$$\text{in vitroPS}_{\text{mdr1a}} = (\% \text{ of in vitroAM} \times \text{in vitroSA}_{\text{total}}) \times \text{in vitroP}_{\text{mdr1a}} \quad (\text{Eq. 3-12})$$

ここで、 $\text{in situP}_{\text{mdr1a}}$ ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{cm}^2$) 及び $\text{in vitroP}_{\text{mdr1a}}$ ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{cm}^2$) は、それぞれ野生型マウス小腸及び L-mdr1a 細胞における mdr1a を介した排出輸送の透過係数を表す. Mdr1a の排出輸送活性は、mdr1a 単位タンパク質発現量当たりの排出輸送活性 (mdr1a 単分子排出輸送活性) と mdr1a タンパク質発現量の積で表されるため、以下の式が得られる.

$$\text{in situ } P_{\text{mdr1a}} = \frac{\text{in situ } T_{\text{mdr1a, int}} \times \text{in situ } A_{\text{mdr1a}}}{\% \text{ of in situ } AM \times \text{in situ } SA_{\text{total}}} \quad (\text{Eq. 3-13})$$

$$\text{in vitro } P_{\text{mdr1a}} = \frac{\text{in vitro } T_{\text{mdr1a, int}} \times \text{in vitro } A_{\text{mdr1a}}}{\% \text{ of in vitro } AM \times \text{in vitro } SA_{\text{total}}} \quad (\text{Eq. 3-14})$$

in situ $T_{\text{mdr1a, int}}$ ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{fmol}$) 及び in vitro $T_{\text{mdr1a, int}}$ ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{fmol}$) は、それぞれ野生型マウス小腸及び L-mdr1a 細胞における mdr1a 単分子排出輸送活性を表す。

従って、Eq. 3-13 及び Eq. 3-14 から Eq. 3-11 及び Eq. 3-12 は、それぞれ次式に変換される。

$$\text{in situ } PS_{\text{mdr1a}} = \text{in situ } T_{\text{mdr1a, int}} \times \text{in situ } A_{\text{mdr1a}} \quad (\text{Eq. 3-15})$$

$$\text{in vitro } PS_{\text{mdr1a}} = \text{in vitro } T_{\text{mdr1a, int}} \times \text{in vitro } A_{\text{mdr1a}} \quad (\text{Eq. 3-16})$$

mdr1a の単分子活性が野生型マウス小腸と L-mdr1a 細胞で変わらないと仮定すると次式が得られる。

$$\text{in situ } T_{\text{mdr1a, int}} = \text{in vitro } T_{\text{mdr1a, int}} \quad (\text{Eq. 3-17})$$

これより、Eq. 3-15 と Eq. 3-16 を統合することができ、以下の Eq. 3-18 が得られ、さらにそれを変形することで Eq. 3-5 が導かれる。

$$\frac{\text{in situ } PS_{\text{mdr1a}}}{\text{in situ } A_{\text{mdr1a}}} = \frac{\text{in vitro } PS_{\text{mdr1a}}}{\text{in vitro } A_{\text{mdr1a}}} \quad (\text{Eq. 3-18})$$

Subsection 5; in vitro 経細胞透過試験による $\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b}$ Ratio の算出方法

PS product は各細胞膜の膜透過係数と表面積の積で定義されるため、 $\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b}$ ratio は次式のように変形される。

$$\begin{aligned} \text{in vitro PS}_{a \text{ to } b} \text{ ratio} &= \frac{\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b} \text{ in LLC-PK1}}{\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b} \text{ in L-mdr1a}} = \frac{\text{in vitro P}_{\text{app}, a \text{ to } b} \text{ in LLC-PK1} \times \text{SA}_{\text{insert}}}{\text{in vitro P}_{\text{app}, a \text{ to } b} \text{ in L-mdr1a} \times \text{SA}_{\text{insert}}} \\ &= \frac{\text{in vitro P}_{\text{app}, a \text{ to } b} \text{ in LLC-PK1}}{\text{in vitro P}_{\text{app}, a \text{ to } b} \text{ in L-mdr1a}} \quad (\text{Eq. 3-19}) \end{aligned}$$

ここで、 $\text{in vitro P}_{\text{app}, a \text{ to } b} \text{ in LLC-PK1}$ 及び $\text{in vitro P}_{\text{app}, a \text{ to } b} \text{ in L-mdr1a}$ は、それぞれ LLC-PK1 及び L-mdr1a 細胞の頂端膜から基底側膜方向の膜透過係数を表す。SA_{insert} は、トランズウェルインサートの表面積を表す。

Eq. 3-19 に従えば、 $\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b}$ ratio は、LLC-PK1 及び L-mdr1a 細胞の頂端膜から基底側膜方向の膜透過係数の比と等しくなり、それは過去に東北大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野の内田 康雄 博士らが報告した値 (Uchida et al., 2011a) から算出できる。

Subsection 6; in vitro 試験系に基づいた $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b}$ ratio の算出方法

Eq. 3-6 及び 3-19 に従うと、 $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b}$ ratio は次式で表される。

$$\text{in situ PS}_{a \text{ to } b} \text{ ratio} = 1 + \left(\frac{\text{in vitro P}_{\text{app}, a \text{ to } b} \text{ in LLC-PK1}}{\text{in vitro P}_{\text{app}, a \text{ to } b} \text{ in L-mdr1a}} - 1 \right) \times \frac{\text{in situ A}_{\text{mdr1a}}}{\text{in vitro A}_{\text{mdr1a}}} \quad (\text{Eq. 3-20})$$

$\text{in vitro P}_{\text{app}, a \text{ to } b} \text{ in LLC-PK1}$ 及び $\text{in vitro P}_{\text{app}, a \text{ to } b} \text{ in L-mdr1a}$ は、LLC-PK1 細胞及び L-mdr1a 細胞を用いた経細胞膜透過試験からそれぞれ算出でき、 $\text{in situ A}_{\text{mdr1a}}$ 及び $\text{in vitro A}_{\text{mdr1a}}$

は、マウス小腸及び L-mdr1a 細胞における mdr1a タンパク質発現量測定からそれぞれ算出できる。従って, $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b}$ ratio は, in vitro 試験系で算出可能である。

Effective absorption ratio の再構築

本実験では, effective absorption ratio を次式で定義した。

effective absorption ratio

$$= \frac{\text{in situ PS}_{a \text{ to } b \text{ in WT}}}{\text{in situ PS}_{a \text{ to } b \text{ in mdr1a/1b (-/-)}}} = \frac{1}{\text{in situ PS}_{a \text{ to } b \text{ ratio}}} \quad (\text{Eq. 3-21})$$

$$\text{in situ PS}_{a \text{ to } b \text{ in WT}} = \text{effective absorption ratio} \times \text{in situ PS}_{a \text{ to } b \text{ in mdr1a/1b (-/-)}}$$

$$(0 < \text{effective absorption ratio} \leq 1) \quad (\text{Eq. 3-22})$$

Eq. 3-22 において, effective absorption ratio は mdr1a を介した排出輸送によって消化管吸収性がどれほど低下するかを反映するパラメータであることを示しており, effective absorption ratio が小さければ小さいほど, 化合物は mdr1a の強い基質であることを意味している。

$\text{in situ PS}_{a \text{ to } b}$ ratio からの Fa の予測

消化管を均一な円柱状の筒とみなす tube モデルに従えば, $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b}$ と Fa の関係は以下の式で表されることが知られている (Amidon et al., 1980; Yuasa et al., 1993)。

$$\text{in situ PS}_{a \text{ to } b} = -\frac{Q}{L} \times \ln(1 - \text{Fa}) \quad (\text{Eq. 3-23})$$

ここで、Q は in situ 小腸灌流試験の灌流速度、L は灌流試験に使用した小腸の長さを表す。

従って、MDR1 の輸送活性が失われた状態 (遺伝子欠損) に対して、MDR1 の輸送活性が存在する状態 (野生型) の in situ $PS_{a \text{ to } b}$ の比を表す in situ $PS_{a \text{ to } b}$ ratio は、以下の式で表される。

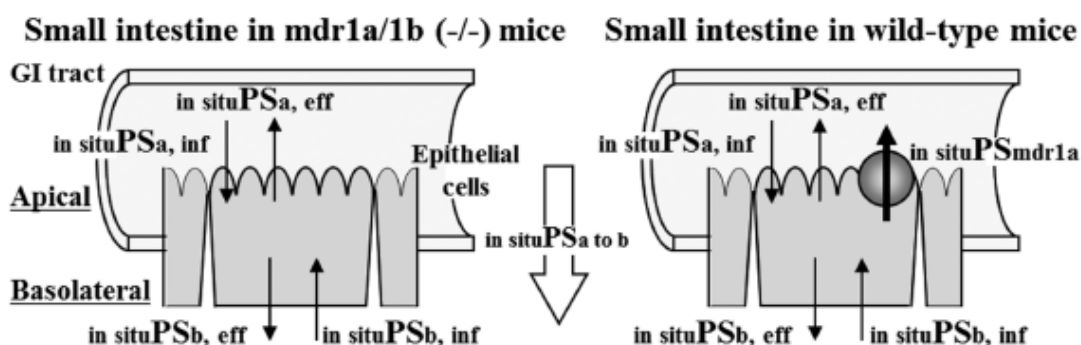
$$\text{in situ } PS_{a \text{ to } b} \text{ ratio} = \frac{\ln(1 - F_{\text{without MDR1}})}{\ln(1 - F_{\text{with MDR1}})} \quad (\text{Eq. 3-24})$$

なお、 $F_{\text{without MDR1}}$ 及び $F_{\text{with MDR1}}$ は、それぞれ、MDR1 の輸送活性が失われた状態 (遺伝子欠損) 及び MDR1 の輸送活性が存在する状態 (野生型) の F_a を表す。さらに、Eq. 3-24 はさらに以下のように変形される。

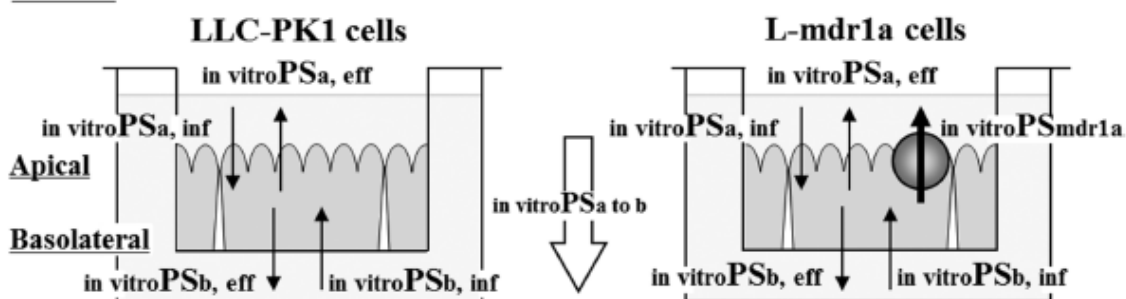
$$F_{\text{with MDR1}} = 1 - (1 - F_{\text{without MDR1}})^{1/\text{in situ } PS_{a \text{ to } b} \text{ ratio}} \quad (\text{Eq. 3-25})$$

$$\frac{F_{\text{without MDR1}}}{F_{\text{with MDR1}}} = \frac{F_{\text{without MDR1}}}{1 - (1 - F_{\text{without MDR1}})^{1/\text{in situ } PS_{a \text{ to } b} \text{ ratio}}} \quad (\text{Eq. 3-26})$$

in situ



in vitro



Scheme 3-1. Schematic Diagram Illustrating the PS Product in the Apical-to-Basolateral Direction in Mouse Small Intestinal Epithelial Cells (*in situ*PS_{a to b}) or in Vitro Cell Monolayers (*in vitro*PS_{a to b}). This schematic diagram has been reported previously by (Adachi et al., 2003). *in situ* PS_{a,inf}, *in situ* PS_{b,inf}, and *in situ* PS_{b,eff} represent the PS products for the apical influx, basolateral influx, and basolateral efflux in mouse small intestinal epithelial cells, respectively. *in situ* PS_{mdr1a} and *in situ* PS_{a, eff} represent the PS products for the mdr1a-mediated efflux in wild-type mice and the apical efflux, with the exception of mdr1a-mediated efflux, in mouse small intestinal epithelial cells, respectively. *in vitro* PS_{a,inf}, *in vitro* PS_{b,inf}, and *in vitro* PS_{b,eff} represent the PS products for the apical influx, basolateral influx, and basolateral efflux in vitro cell monolayers, respectively. *in vitro* PS_{mdr1a} and *in vitro* PS_{a, eff} represent the PS products for the mdr1a-mediated efflux in L-mdr1a cells and the apical efflux, with the exception of mdr1a-mediated efflux, in vitro cell monolayers, respectively.

第3節 結果

L-mdr1a 細胞における mdr1a のタンパク質発現量測定

LC-MS/MS を用いた膜タンパク質絶対定量法を用いて, L-mdr1a 細胞の細胞膜画分における mdr1a のタンパク質発現量を測定したところ, 45.7 ± 1.4 fmol/ μ g plasma membrane protein (mean \pm SEM) という結果が得られた.

マウス空腸及び L-mdr1a 細胞の mdr1a タンパク質発現量の差に基づいた, in vitro $PS_{a \text{ to } b}$ ratio からの in situ $PS_{a \text{ to } b}$ ratio の再構築

Mdr1a の基質薬 6 化合物 (quinidine, digoxin, loperamide, vinblastine, verapamil 及び dexamethasone) 及び非基質 1 化合物 (diazepam) の計 7 化合物について, Eq. 3-20 を用いて in situ $PS_{a \text{ to } b}$ ratio を再構築した (Table 3-1). 7 化合物の L-mdr1a 及び LLC-PK1 細胞の頂端膜から基底側膜方向への膜透過係数 (in vitro $P_{app, a \text{ to } b}$ in L-mdr1a 及び in vitro $P_{app, a \text{ to } b}$ in LLC-PK1) は, Uchida らが報告した値 (Uchida et al., 2011a) を引用した. マウス小腸の mdr1a タンパク質発現量については, Adachi らが実施した in situ 小腸灌流試験では空腸を使用していたため, in situ A_{mdr1a} はマウス空腸の細胞膜画分における mdr1a タンパク質発現量 (7.57 fmol/ μ g plasma membrane protein) を使用し (Table 2-2), in vitro A_{mdr1a} は本研究で新たに測定した L-mdr1a 細胞の細胞膜画分における mdr1a タンパク質発現量 (45.7 fmol/ μ g plasma membrane protein) を使用した. これらのデータから再構築した 7 化合物の in situ $PS_{a \text{ to } b}$ ratio は, Adachi らが過去に報告した実測値 (Adachi et al., 2003) と比較して 2.1 倍以内の範囲で一致した (Table 3-1, Figure 3-1).

Effective absorption ratio の再構築

Adachi らが報告した実測の in situ $PS_{a \text{ to } b}$ ratio (Adachi et al., 2003) 及び再構築した in situ $PS_{a \text{ to } b}$ ratio から Eq. 3-21 に従い, 実測及び再構築した effective absorption ratio

を算出したところ, *mdr1a* 基質 6 化合物 (quinidine, digoxin, loperamide, vinblastine, verapamil 及び dexamethasone) 及び非基質薬 1 化合物 (diazepam) の計 7 化合物について, 実測値と再構築値は 2.1 倍以内の範囲で一致した (Figure 3-2).

Table 3-1. Reconstruction of $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b}$ Ratio from $\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b}$ Ratio and Protein Expression Levels of Mdr1a in the Plasma Membrane Fractions of Isolated Jejunal Epithelial Cells and Mdr1a-Transfected LLC-PK1 Cell Monolayers

Compounds	$\text{in vitro } P_{\text{app, a to b}} (\times 10^{-6} \text{ cm/s})^*$		$\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b} \text{ ratio}$	Reconstructed $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b} \text{ ratio}$
	LLC-PK1	L-mdr1a		
Quinidine	57.2 \pm 7.6	3.16 \pm 0.10	18.1 \pm 1.7	3.83 \pm 0.23
Digoxin	11.8 \pm 2.3	1.13 \pm 0.11	10.4 \pm 1.6	2.56 \pm 0.20
Loperamide	49.7 \pm 1.9	5.49 \pm 0.51	9.05 \pm 0.64	2.33 \pm 0.09
Vinblastine	24.2 \pm 7.7	2.83 \pm 0.56	8.55 \pm 2.27	2.25 \pm 0.27
Verapamil	73.5 \pm 6.6	11.9 \pm 0.1	6.18 \pm 0.39	1.86 \pm 0.06
Dexamethasone	29.5 \pm 0.2	6.91 \pm 0.22	4.27 \pm 0.10	1.54 \pm 0.02
Diazepam	31.8 \pm 2.1	57.3 \pm 4.5	0.555 \pm 0.040	0.926 \pm 0.005

According to Eq. 3-20, the values of reconstructed $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b}$ ratio were calculated from the P_{app} in apical-to-basolateral direction ($\text{in vitro } P_{\text{app, a to b}}$) in the parental LLC-PK1 cell monolayers and L-mdr1a cell monolayers with the protein expression levels of mdr1a in the plasma membrane fractions of isolated jejunal epithelial cells and L-mdr1a cell monolayers. The protein expression levels of mdr1a were 7.57 fmol/ μg plasma membrane protein in mouse jejunum and 45.7 fmol/ μg plasma membrane protein in L-mdr1a cell monolayers. Each value represents the mean \pm S.E.M. The value of S.E.M. was calculated according to the law of propagation of errors as described by Uchida et al. (2011a).

*Data were taken from Uchida et al. (2011a).

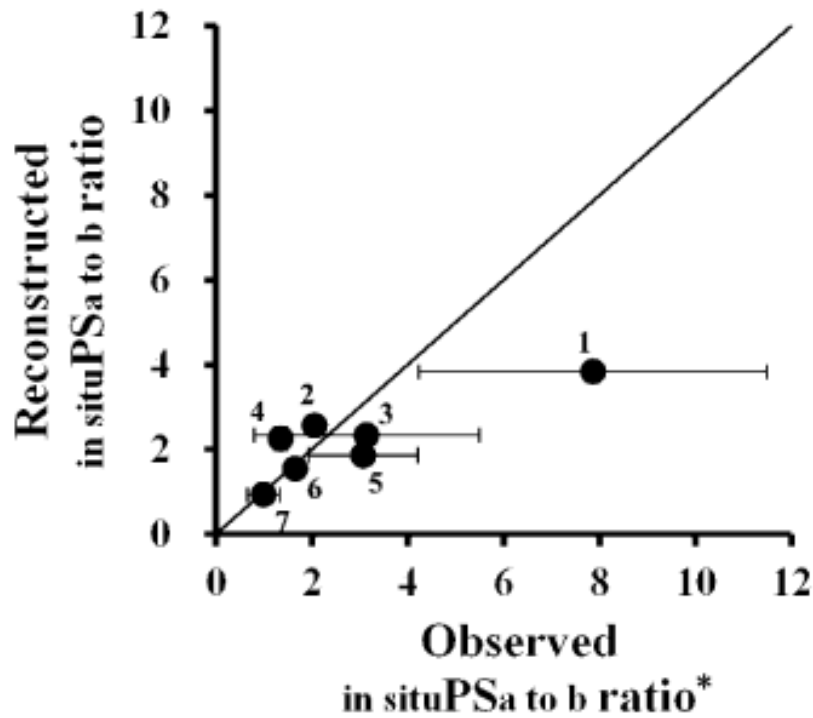


Figure 3-1. Comparison of observed and reconstructed $\text{in situ PS}_a \text{ to } b$ ratios. The reconstructed $\text{in situ PS}_a \text{ to } b$ ratios were taken from Table 3-1. The solid line passing through the origin represents the line of identity. Each point represents the mean \pm S.E.M. The value of S.E.M. was calculated according to the law of propagation of errors as described by (Uchida et al., 2011a). 1, quinidine; 2, digoxin; 3, loperamide; 4, vinblastine; 5, verapamil; 6, dexamethasone; 7, diazepam.

*Data were taken from Adachi et al. (2003).

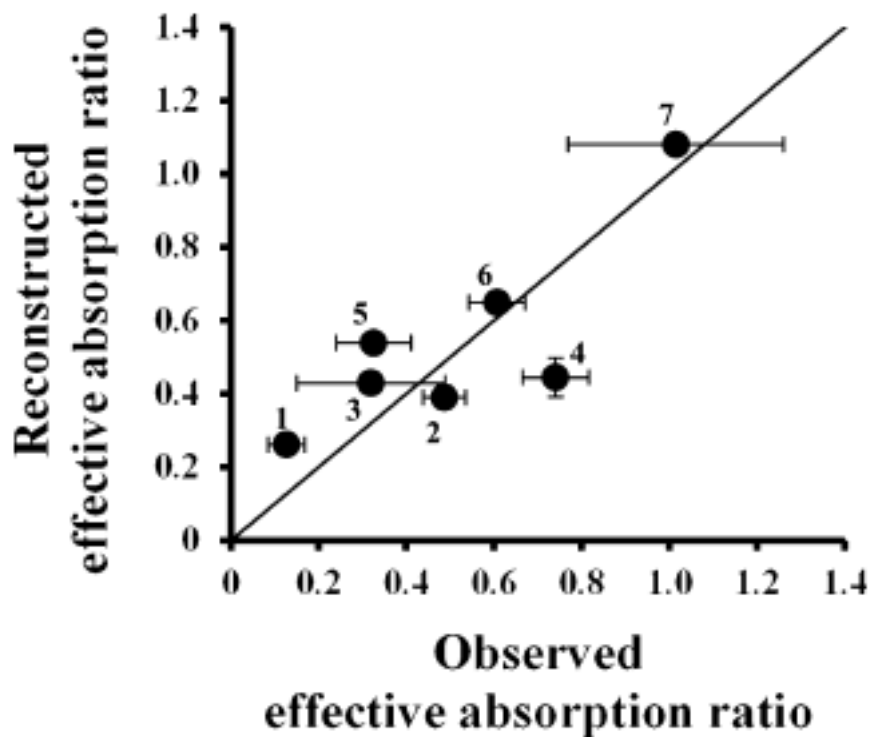


Figure 3-2. Comparison of observed and reconstructed effective absorption ratios. According to Eq. 3-21, the values of observed and reconstructed effective absorption ratio were calculated from the *in situ* $PS_{a \text{ to } b}$ ratio. The observed *in situ* $PS_{a \text{ to } b}$ ratios were taken from Adachi et al. (2003) and the reconstructed *in situ* $PS_{a \text{ to } b}$ ratios were taken from Table 3-1. The solid line passing through the origin represents the line of identity. Each point represents the mean \pm S.E.M. The value of S.E.M. was calculated according to the law of propagation of errors as described by Uchida et al. (2011a). 1, quinidine; 2, digoxin; 3, loperamide; 4, vinblastine; 5, verapamil; 6, dexamethasone; 7, diazepam.

第4節 考察

本研究では, *mdr1a* の基質薬 6 化合物 (quinidine, digoxin, loperamide, vinblastine, verapamil 及び dexamethasone) 及び非基質 1 化合物 (diazepam) の計 7 化合物について, L-*mdr1a* 細胞における *mdr1a* の輸送活性を L-*mdr1a* 細胞及びマウス小腸の細胞膜画分における *mdr1a* タンパク質発現量比で外挿することで再構築した *in situ* $PS_{a \rightarrow b}$ ratio は, 実測値と 2.1 倍以内の範囲で一致するという結果が得られた (Figure 3-1). 本解析は, *mdr1a* 単分子輸送活性が *in situ* 及び *in vitro* 試験系で変わらないという仮定に基づいて再構築の理論式を構築した. *Mdr1a* 単分子輸送活性は, 炎症性サイトカインによって変動することが示唆されているため (Hartz et al., 2006), 消化管内容物等が小腸上皮細胞における *mdr1a* 単分子輸送活性に影響を与えたと考えられたが, 本結果から少なくとも健常マウスにおいては, 小腸の *mdr1a* 単分子輸送活性に対しては影響がないことが示唆された.

本再構築理論は, 消化管吸収における個々のトランスポーターの寄与について調べることができる. *Mdr1a* と同様に, 小腸には *bcrp* 及び *mrp2* のような排出トランスポーターも発現しており (Jonker et al., 2002; Zaher et al., 2006; van Waterschoot et al., 2010; Karibe et al., 2015), それらの機能についても同様の方法論で *in vitro* 経細胞膜透過試験から再構築できると推察される.

第2章では, ヒト小腸における P-gp のタンパク質発現量を定量したが, ヒト P-gp の安定発現株での経細胞膜透過試験を行うことで, 本方法論をヒト小腸に対しても適応可能と推察される. また, 本再構築の手法は P-gp 基質の F_a の予測に有用な可能性がある. Eq. 3-25 では, *in situ* $PS_{a \rightarrow b}$ ratio 及び P-gp (MDR1) の輸送活性が失われた状態での小腸吸収率である $F_{a \text{ without MDR1}}$ を算出できれば, P-gp (MDR1) の輸送活性が存在する状態での小腸吸収率である $F_{a \text{ with MDR1}}$ を導けることを表している. P-gp の選択的な基質では, 他のトランスポーターの影響を受けずに受動拡散を介して小腸吸収されると仮定すると, 受動拡散によって小腸

を吸収する化合物は、PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) 等人工膜を用いた *in vitro* 試験系で F_a が予測できることが示唆されていることから (Sugano et al., 2002; Chen et al., 2008), それを用いることで $F_{a\text{without MDR1}}$ を算出できる可能性がある. さらに *in situ* $PS_{a\text{ to }b}$ ratio について, 再構築の方法論に従い, *in vitro* 経細胞膜透過試験から算出できれば, *in vitro* 試験から $F_{a\text{with MDR1}}$ を予測できる可能性が推察される. さらに, Eq. 3-26 の左辺は, 併用薬との薬物間相互作用によって P-gp の排出輸送が完全に阻害された際の F_a の最大上昇率を表しており, ヒト小腸の P-gp を介した DDI リスクを *in vitro* 試験から予測する上で有用である可能性が期待される.

小腸上皮細胞の頂端膜には微絨毛が発達しているため, 頂端膜及び基底側膜の表面積には大きな違いがある. ラット小腸では, 電子顕微鏡での解析によって微絨毛を考慮しなければ, 約 20 倍表面積が異なることが報告されている (Mayhew and Middleton, 1985). しかし, LLC-PK1 細胞や MDCK 細胞単層膜のような培養尿細管上皮細胞では, 頂端膜ではほとんど微絨毛が存在せず, MDCK 細胞では頂端膜と基底側膜の表面積がほとんど変わらないことが示されている (Gstraunthaler et al., 1985). この結果は, 小腸と LLC-PK1 細胞では, 単位細胞あたりの頂端膜と基底側膜の表面積の割合が異なることを支持している. このため本研究では, Subsection 3 及び 4 に記載したように, 単位細胞あたりの頂端膜と基底側膜の割合を考慮し, *in situ* $PS_{a\text{ to }b}$ ratio を再構築した. しかし, 各膜の割合は, 再構築に使用する式を導く過程で相殺され, 最終式 (Eq. 3-20) には含まれていない. 従って, *mdr1a* の排出活性を再構築する上では, マウス小腸及び LLC-PK1 細胞における頂端膜及び基底側膜の表面積の割合の違いによる影響は受けないことを支持している.

本再構築の理論では, Eq. 3-7 で示すように, マウス小腸及び LLC-PK1 細胞において, 頂端膜及び基底側膜での受動拡散を介した排出の膜透過係数が全て等

しいと仮定した。マウス小腸及び LLC-PK1 細胞、さらには頂端膜及び基底側膜では、膜を構成するリン脂質の構成分子とその割合が異なることが報告されており (Kawai et al., 1974; Morita et al., 2011), 細胞膜の種類が異なれば受動拡散速度が異なる可能性が推察される。しかし Nishimura らは、ラット及びサル小腸において、細胞膜を受動拡散を介して透過する midazolam の頂端膜及び基底側膜の排出膜透過係数はほぼ等しいことを報告している (Nishimura et al., 2007). さらに、LLC-PK1 細胞とイヌ腎臓細胞単層膜である MDCKII 細胞は細胞膜を構成するリン脂質の割合が異なるが (Delaunay et al., 2008; Morita et al., 2011), 受動拡散を介した膜透過係数は、両細胞でほぼ等しいことが示されている (Kodaira et al., 2011). 従って、これらの結果から、細胞膜を構成するリン脂質の割合が異なっても受動拡散による膜透過係数は等しく、マウス小腸及び LLC-PK1 細胞の頂端膜及び基底側膜の受動拡散による膜透過係数についても全て等しくなることを支持している。

頂端膜における細胞内への取り込みクリアランス (PS_{inf}) について、マウス小腸及び LLC-PK1 細胞で異なる可能性がある。Adachi らが実施した *in situ* 小腸灌流試験では pH 6.4 の薬液を使用しているが (Adachi et al., 2003), Uchida らが実施した *in vitro* 経細胞膜透過試験では pH 7.4 の薬液を使用している (Uchida et al., 2011a). 薬液の pH は、化合物のイオン型と分子型の割合を変えるため、化合物の膜透過性に対して影響を与えることが報告されている (Yamashita et al., 2000). 従って、異なる pH で行っている *in situ* 小腸灌流試験及び *in vitro* 経細胞膜透過試験においても、 PS_{inf} の大きさが異なることが想定される。さらに、pH の違いに加えて、非攪拌水槽膜の厚みについても小腸と *in vitro* 細胞単層膜で異なることが報告されている (Anderson et al., 1988; Levitt et al., 1990; Korjamo et al., 2009). 特に高膜透過性化合物は、 PS_{inf} に対して非攪拌水槽の影響を受け、そのような化合物はヒト小腸と Caco-2 細胞での非攪拌水槽の違いが影響し、両者の膜透過性

に約 5 倍の差があることが報告されている (Lennernas, 1998). 以上のように, pH 及び非攪拌水槽の違いによって, 小腸と *in vitro* 細胞単層膜における PS_{inf} に乖離が生じると考えた. しかし, 仮に PS_{inf} がマウス小腸と *in vitro* 細胞単層膜で異なっていたとしても, その影響は *in situ* $PS_{a \text{ to } b} \text{ ratio}$ 及び *in vitro* $PS_{a \text{ to } b} \text{ ratio}$ の式を導く過程で相殺されるため, 再構築の結果に対して影響はないと考えられる.

小腸トランスポーターの再構築を成功させるためには, トランスポーターのタンパク質定量において, 小腸上皮細胞及び細胞膜画分の純度が重要である. 単離した小腸上皮細胞は, 上皮細胞以外にも粘膜層や筋層等の上皮細胞以外の細胞が混入する可能性がある. 加えて, スクロース密度勾配遠心による細胞膜の調製過程でミクロソーム画分等の他の膜画分が混入する可能性があり, マウス小腸上皮細胞と L-mdr1a 細胞において細胞膜画分の純度が異なる可能性がある. 仮に, 単離した上皮細胞及びその細胞膜画分の純度が低ければ, 小腸の mdr1a のタンパク質発現量が過小評価されるため, 再構築した *in situ* $PS_{a \text{ to } b} \text{ ratio}$ は低くなる. しかし, 本研究では, 再構築した *in situ* $PS_{a \text{ to } b} \text{ ratio}$ は実測値と良好に相関しているため, 単離した上皮細胞及びその細胞膜画分の純度の影響は小さいと示唆される. ただし, 評価した 7 化合物のうち, mdr1a の基質性が最も高い quinidine では, 再構築した *in situ* $PS_{a \text{ to } b} \text{ ratio}$ は実測値よりも 2.1 倍低く (Figure 3-1), 単離した上皮細胞及びその細胞膜画分の純度が低いことが影響している可能性が推察される. 上皮細胞を純度高く単離するためには, 上皮細胞マーカーを用いた細胞 FACS (Fluorescence activated cell sorting) 及び MACS (Magnetic-activated cell sorting) 等の細胞純化技術が有効であり, より高確度かつ高精度に再構築を行えると考えられる. また, マウス小腸及び L-mdr1a 細胞の細胞膜画分の純度を均一化するための施策として, mdr1a タンパク質発現量を膜マーカーのそれで補正する方法が考えられる. L-mdr1a 細胞では測定していないが, マウス小腸では, 頂端膜マーカーとして γ -gtp, 基底側膜マーカーとして $Na^+/K^+-ATPase$ を測定した

(Curthoys and Shapiro, 1975; Achler et al., 1989). 既報によれば, γ -gtp 及び Na^+/K^+ -ATPase のタンパク質発現量は組織によって異なることが報告されている (Kamiie et al., 2008). 従って, 膜マーカーのタンパク質発現量で *mdr1a* のタンパク質発現量を補正する手法は, 本再構築の検証には適応しなかった.

再構築の方法論の妥当性検証には, 評価化合物がターゲットトランスポーターの選択的な基質である必要がある. 本再構築の理論においては, *mdr1a* 以外の膜透過過程は, 他のトランスポーターの影響を受けず, 受動拡散によるものと仮定した. 本研究で評価した 7 化合物のうち, *digoxin* は, 小腸の基底側膜に発現し細胞内から血液側への排出輸送に関与する *osta*/ β の基質になることが知られている (Seward et al., 2003). Eq. 3-1 に従うと, マウス小腸で *osta*/ β の輸送の寄与があった場合には, $\text{in situ PS}_{b, \text{eff}}$ が高まり, 実測の $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b}$ ratio は再構築のそれよりも小さくなると推察される. Stephens らは *digoxin* について, 野生型マウスと *mdr1a* (-/-) の空腸での頂端膜から基底側膜及び基底側膜から頂端膜の両方向の膜透過性を Ussing chamber システムを用いて調べている (Stephens et al., 2002). その結果によれば, *mdr1a* の排出輸送の影響で野生型マウスにおいては, 基底側膜から頂端膜方向の膜透過性が頂端膜から基底側膜方向の膜透過性よりも高くなったが, *mdr1a* (-/-) マウスにおいては, 両方向の膜透過性に対して顕著な差はなかった. この結果は, *digoxin* のマウス小腸吸収過程では *mdr1a* が主に寄与し, *osta*/ β の寄与は小さいことを示唆している. また, L-*mdr1a* 細胞及び LLC-PK1 細胞はブタ尿細管上皮細胞であるため, 内在する腎トランスポーターによって, 本再構築の結果に影響を及ぼす可能性が考えられる. 仮に, 内在性トランスポーターの影響で $\text{in vitro PS}_{a, \text{eff}}$ または $\text{in vitro PS}_{b, \text{eff}}$ の値が高まった場合, Eq. 3-2 に従うと $\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b}$ ratio の値が高くなり, Eq. 3-20 を用いて再構築した $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b}$ ratio は小さくなる. しかし, 評価した 7 化合物が LLC-PK1 細胞に発現する内在性トランスポーターによる輸送の影響を受けなければ, LLC-PK1 細胞における

頂端膜から基底側膜方向の膜透過性に対する基底側膜から頂端膜方向の膜透過性の比はほぼ 1 になるが、Uchida らの報告によれば、その値は 0.5-2 であり、内因性トランスポーターによる輸送の影響は軽微であると考えられる (Uchida et al., 2011a).

また本研究では、effective absorption ratio を Eq. 3-21 のように定義した。Effective absorption ratio は、mdr1a を介した排出輸送によって消化管吸収性がどれほど低下するかを反映するパラメータであることを示しており、effective absorption ratio が小さければ小さいほど、化合物は mdr1a の強い基質であることを意味しているが、本パラメータについても in vitro 試験系における mdr1a 輸送活性から再構築した結果、実測値と 2.1 倍以内の範囲で一致した (Figure 3-2).

結論として、本実験では、小腸吸収に対するトランスポーターの影響を in vitro 試験系から定量的に予測する方法を開発するため、マウス小腸における mdr1a の輸送活性が in vitro 試験から再構築可能か検証した。その結果、mdr1a 基質 6 化合物 (quinidine, digoxin, loperamide, vinblastine, verapamil 及び dexamethasone) 及び非基質薬 1 化合物 (diazepam) の小腸における mdr1a 輸送活性について、mdr1a 安定発現株での輸送活性をマウス小腸及び mdr1a 安定発現株の細胞膜画分における mdr1a タンパク質発現量比で外挿し再構築した結果、実測値と 2.1 倍以内の範囲で一致した。本検証は、mdr1a の単分子輸送活性が in situ 及び in vitro 試験系で変わらないという仮定に基づいて行ったため、本結果から少なくとも健常マウスにおいて、mdr1a の単分子輸送活性は、小腸と L-mdr1a 細胞間で変わらないことが示唆された。P-gp/mdr1a の単分子輸送活性は、炎症性サイトカインによって変動することが示唆されており (Hartz et al., 2006)、さらに、小腸の P-gp/mdr1a の発現量についても、病態時で変動することが示唆されている (Iizasa et al., 2003; Nawa et al., 2010)。今後の課題として、病態時の発現量変動を考慮した再構築が可能か検討する必要がある。

第4章 ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を用いたプロドラッグの加水分解性及び薬物吸収予測

第1節 序論

近年、複数の研究機関において、ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞を作製する手法が報告されている (Spence et al., 2011; Kauffman et al., 2013; Ogaki et al., 2013; Forbester et al., 2015; Iwao et al., 2015; Ozawa et al., 2015; Uchida et al., 2017). iPS 小腸は、BCRP や PEPT1 のようなトランスポーターや、CYP3A4 や CES2 のような代謝酵素の発現及び活性が確認されているため、ヒトにおける小腸吸収性を予測するためのモデルとして期待されている (Iwao et al., 2015; Ogaki et al., 2015; Ozawa et al., 2015; Kodama et al., 2016; Kabeya et al., 2017; Uchida et al., 2017).

これまで医薬品開発研究において、ヒト Fa を予測するための細胞として結腸癌由来細胞株である Caco-2 細胞が広く用いられてきた (Artursson and Karlsson, 1991). iPS 小腸と Caco-2 細胞と大きな違いの 1 つに、エステル型プロドラッグの加水分解に重要な CES の発現パターンが異なる点が報告されている (Kabeya et al., 2017). 小腸では、CES2 が主要の加水分解酵素であるが、Caco-2 細胞では肝臓型加水分解酵素である CES1 が CES2 よりも高発現していることが知られている (Imai et al., 2005). そのため、temocapril や dabigatran etexilate のような CES1 の基質となるプロドラッグでは、Caco-2 細胞での加水分解活性がヒト生体よりも過大評価されることが示されており、Caco-2 細胞を用いたプロドラッグの経口吸収性を評価することは難しい (Imai et al., 2005; Ishiguro et al., 2014). 一方で iPS 小腸は、ヒト小腸と同様に CES1 よりも CES2 の方が高発現することが報告されていることから (Kabeya et al., 2017), Caco-2 細胞で困難であったプロドラッグの小腸加水分解評価に有用であると期待される. さらに、プロドラッグ以外の薬物に対しても、Kodama らは、5 化合物について iPS 小腸の膜透過性とそれらのヒト Fa の値を比較したところ、それらは相関することが示されている

(Kodama et al., 2016). しかし、その化合物群は全て受動拡散によって細胞膜と透過する化合物であり、トランスポーターの基質薬に対しても同様に相関するかは不明である.

そこで、本研究では既報 (Spence et al., 2011) に従い iPS 小腸を作製し、それらが加水分解及びトランスポーターの活性を有しているか調べた. 次に、iPS 小腸における加水分解活性が *in vivo* の機能を反映するか調べるために、ラットについてプロドラッグ 6 化合物について、それらのプロドラッグをラットに経口投与した細胞の活性体の血漿中暴露量と相関するか調べた. さらに、P-gp 基質薬 (doxorubicin 及び [³H]digoxin), BCRP 基質薬 (sulfasalazine) 及びそれらの非基質薬 11 化合物 (ganciclovir, [¹⁴C]mannitol, famotidine, sulpiride, atenolol, furosemide, ranitidine, hydrochlorothiazide, acetaminophen, propranolol 及び antipyrine) の計 14 化合物について、iPS 小腸の膜透過性とヒト Fa 値を比較した. これらによって、iPS 小腸の機能が *in vivo* での薬物吸収特性を反映するか検証することを目的とした.

第2節 結果

ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導

本研究では, Spence らが報告した iPS 小腸作製方法に従い, ヒト iPS 細胞から内胚葉及び後腸への分化誘導を介して小腸上皮細胞を分化誘導した (Spence et al., 2011). 内胚葉に分化誘導した細胞では, 内胚葉マーカーである SRY (sex determining region Y)-box 17 (SOX17), forkhead box protein A2 (FOXA2) 及び GATA binding protein 4 (GATA4) の遺伝子発現が iPS 細胞よりも高まった (Figure 4-1A). また免疫染色においても, SOX17 のタンパク発現が内胚葉に分化誘導した細胞では検出されたが, iPS 細胞では検出されなかった (Figure 4-1B). 引き続き内胚葉から後腸に分化誘導した細胞では, 後腸マーカーである caudal type homeobox 2 (CDX2) の遺伝子発現が iPS 細胞及び内胚葉よりも高まった (Figure 4-1A). また, 免疫染色においても, CDX2 のタンパク発現が後腸に分化誘導した細胞では検出されたが, iPS 細胞及び内胚葉では検出されなかった (Figure 4-1B). さらに, 未分化マーカーである octamer-binding transcription factor 3/4 (OCT3/4) 及び SRY (sex determining region Y)-box 2 (SOX2) の遺伝子発現量は, 内胚葉及び後腸への分化誘導の過程で低下した (Figure 4-1A). さらに後腸から小腸オルガノイドを分化誘導し, さらに MACS で小腸上皮細胞を純化した. 純化した小腸上皮細胞をトランズウェルインサート上に播種し, 21 日間培養を行った. 腸細胞マーカー [leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5) 及び intestine specific homeobox (ISX)], 小腸上皮細胞マーカー [villin-1 (VIL) 及び sucrase-isomaltase (SI)], パネート細胞マーカー lysozyme (LYZ), 内分泌細胞マーカー chromogranin A (CHGA), 杯細胞マーカー [mucin 2 (MUC2) 及び trefoil factor 3 (TFF3)] の発現が iPS 細胞と比較して高まった (Figure 4-2).

iPS 小腸, iPS 細胞, Caco-2 細胞, 成人/胎児小腸におけるトランスポーター及び

代謝酵素の遺伝子発現量解析

iPS 小腸は、トランズウェルインサート上に播種し、0 日 (播種前)、7 日、14 日及び 21 日経過後の発現量を測定した。Caco-2 細胞はトランズウェルインサート上に播種して 21 日経過後の発現量を測定した。成人小腸は、5 ドナー (20-61 歳) をプールした小腸組織由来、胎児小腸は 1 ドナー分 (懐胎 26 週) の小腸組織由来のサンプルを使用した。上述の各のサンプルについて、トランスポーター (P-gp, BCRP 及び PEPT1) 及び代謝酵素 (CYP3A4, CYP3A7, CES1, CES2 及び UGT1A1) の遺伝子発現量を測定した (Figure 4-3)。

iPS 小腸をトランズウェルインサート上に播種する前と播種 21 日後の発現量を比較すると、P-gp, BCRP, PEPT1, CYP3A4, CES2 及び UGT1A1 は 5.13 倍, 16.7 倍, 2.08 倍, 5.06 倍, 1.70 倍及び 3.29 倍, 播種 21 日後の方が播種前よりもそれぞれ高かった。一方で、CYP3A7 及び CES1 については、それぞれ 3.87 倍及び 7.38 倍, 播種 21 日後の方が播種前よりも低かった。トランズウェルインサート上に播種 21 日後の iPS 小腸と成人小腸の発現量を比較すると、P-gp, BCRP, PEPT1, CYP3A4, CES1, CES2 及び UGT1A1 は、それぞれ 11.1 倍, 11.6 倍, 4.59 倍, 274 倍, 336 倍, 16.4 倍及び 4.46 倍, 成人小腸よりも iPS 小腸の方が低かった。トランズウェルインサート上に播種 21 日後の iPS 小腸と Caco-2 細胞の発現量を比較すると、P-gp, BCRP, PEPT1 及び CES1 は、それぞれ 4.55 倍, 3.76 倍, 1.02 倍及び 7580 倍, Caco-2 細胞よりも iPS 小腸の方が低く、CYP3A4, CYP3A7, CES2 及び UGT1A1 はそれぞれ 30.6 倍, 18.8 倍, 1.33 倍及び 16.9 倍, Caco-2 細胞よりも iPS 小腸の方が高かった。

iPS 小腸及び Caco-2 細胞におけるタイトジャンクションの形成

本研究では、iPS 小腸における経上皮電気抵抗 (transepithelial electrical resistance; TEER) 及びパラセルラー透過マーカー [^{14}C]mannitol の透過性をタイト

ジャンクション形成の指標とした。iPS 小腸の TEER 値は、トランズウェルインサートに播種後 21 日まで 1-3 日ごとに測定した。iPS 小腸の TEER 値は徐々に高まり、播種 21 日後に $299 \pm 11 (\Omega \times \text{cm}^2)$ を示した (Figure 4-4)。一方、Caco-2 細胞は播種 21 日後に $891 \pm 26 (\Omega \times \text{cm}^2)$ を示した。トランズウェルインサートに播種 21 日後の iPS 小腸及び Caco-2 細胞における $[^{14}\text{C}]\text{mannitol}$ の透過性は $0.222 \pm 0.020 (\times 10^{-6} \text{ cm/sec})$ 及び $0.167 \pm 0.007 (\times 10^{-6} \text{ cm/sec})$ と算出され、両者に有意な差は認められなかった (Figure 4-4)。

iPS 小腸における P-gp 及び BCRP の機能発現

iPS 小腸が P-gp 及び BCRP の機能を有しているかは、頂端膜から基底側膜及び基底側膜から頂端膜の両方向の透過試験を実施し、Eq. 6-5 で算出される efflux ratio を指標に確認した。

P-gp 基質の $[^3\text{H}]\text{digoxin}$ の透過性は頂端膜から基底側膜方向よりも基底側膜から頂端膜方向の方が高く (efflux ratio = 2.43 ± 0.18)、その efflux ratio は P-gp 阻害剤の cyclosporin A ($10 \mu\text{M}$) によって 0.743 ± 0.083 に減少した (Figure 4-5A)。

また、BCRP 基質の sulfasalazine の透過性は頂端膜から基底側膜方向よりも基底側膜から頂端膜方向の方が高く (efflux ratio = 3.65 ± 0.49)、その efflux ratio は BCRP 阻害剤の KO143 ($0.1 \mu\text{M}$) によって 1.16 ± 0.33 に減少した (Figure 4-5B)。

iPS 小腸における PEPT1 の機能発現

iPS 小腸が PEPT1 の機能を有しているかは、頂端膜から基底側膜方向の透過試験によって確認した。PEPT1 基質の $[^{14}\text{C}]\text{glycylsarcosine}$ ($10 \mu\text{M}$) の透過性は $7.90 \pm 0.31 (\times 10^{-6} \text{ cm/sec})$ と算出され、その膜透過性は高濃度の glycylsarcosine (10 mM) によって $1.56 \pm 0.17 (\times 10^{-6} \text{ cm/sec})$ まで低下した (Figure 4-5C)。

iPS 小腸における CYP3A4, CES2 及び CES1 の機能発現

iPS 小腸及び Caco-2 細胞が CYP3A4, CES2 及び CES1 の機能を有しているかは, Eq. 6-6 で算出される extraction ratio を指標に確認した.

iPS 小腸における CYP3A4 基質 midazolam から 1-OH midazolam への代謝に対する extraction ratio は 0.534 ± 0.009 (%) と算出され, CYP3A4 阻害剤の $0.5 \mu\text{M}$ 及び $10 \mu\text{M}$ ketoconazole によってそれぞれ 0.322 ± 0.009 (%) 及び 0.0821 ± 0.0064 (%) に低下した. 同様に, Caco-2 細胞における extraction ratio は 0.0623 ± 0.0038 (%) と算出され, $0.5 \mu\text{M}$ 及び $10 \mu\text{M}$ ketoconazole によってそれぞれ 0.0404 ± 0.0023 (%) 及び 0.0414 ± 0.0032 (%) に低下した (Figure 4-6A).

iPS 小腸における CES2 基質 irinotecan から SN38 への代謝に対する extraction ratio は 3.52 ± 0.15 (%) と算出され, CES2 阻害剤の $100 \mu\text{M}$ telmisartan によって 2.42 ± 0.17 (%) に低下した. 同様に, Caco-2 細胞における extraction ratio は 3.96 ± 0.55 (%) と算出され, CES2 阻害剤の $100 \mu\text{M}$ telmisartan によって 2.30 ± 0.30 (%) に低下した (Figure 4-6B).

iPS 小腸における CES1 基質 temocapril から temocaprilat への代謝に対する extraction ratio は CES 阻害剤の $500 \mu\text{M}$ bis-*p*-nitrophenyl phosphate (BNPP) 非存在下及び存在下でそれぞれ 4.17 ± 0.22 (%) 及び 5.18 ± 0.30 (%) と算出された. 一方, Caco-2 細胞においては $500 \mu\text{M}$ BNPP 非存在下及び存在下でそれぞれ 99.0 ± 0.1 (%) 及び 1.29 ± 0.07 (%) と算出された (Figure 4-6C).

エステル型プロドラッグ 6 化合物の iPS 小腸における加水分解活性とラット PK パラメータの比較

iPS 小腸におけるエステル型プロドラッグ 6 化合物の加水分解活性は式 Eq. 6-7 で算出される CL_{int} を指標として評価した. iPS 小腸における CL_{int} は, エステル型プロドラッグをラットに経口投与した際の活性体の血漿中濃度から計算さ

れる最高血漿中濃度 (C_{\max}), AUC 及び BA と良好に相関した (相関係数はそれぞれ 0.840, 0.815 及び 0.815) (Table 4-1, Figure 4-7).

iPS 小腸における 14 化合物の膜透過性とヒト Fa 値との比較

iPS 小腸の膜透過性からヒト Fa 値が予測できるか調べるために, P-gp 基質薬 (doxorubicin 及び [^3H]digoxin), BCRP 基質薬 (sulfasalazine) 及びそれらの非基質薬 11 化合物 (ganciclovir, [^{14}C]mannitol, famotidine, sulpiride, atenolol, furosemide, ranitidine, hydrochlorothiazide, acetaminophen, propranolol 及び antipyrine) の計 14 化合物について, iPS 小腸の膜透過性を Eq. 6-4 を用いて算出し, ヒト Fa 値と比較した (Table 4-2, Figure 4-8). Amidon らの報告 (Amidon et al., 1988) によれば, 消化管内での薬物移行が well-stirred モデルに従うと仮定すると, 小腸入口と出口の薬物濃度比 ($C_{\text{out}}/C_{\text{in}} = 1 - \text{Fa}$) は次式で表される.

$$C_{\text{out}}/C_{\text{in}} = e^{\{- (S/V) \times P_{\text{app}} \times t_{\text{res}}\}} \quad (\text{Eq. 4-1})$$

$$\text{Fa} = 1 - e^{\{- (S/V) \times P_{\text{app}} \times t_{\text{res}}\}} = e^{-SF \times P_{\text{app}}} \quad (\text{Eq. 4-2})$$

$$(SF = (S/V) \times t_{\text{res}})$$

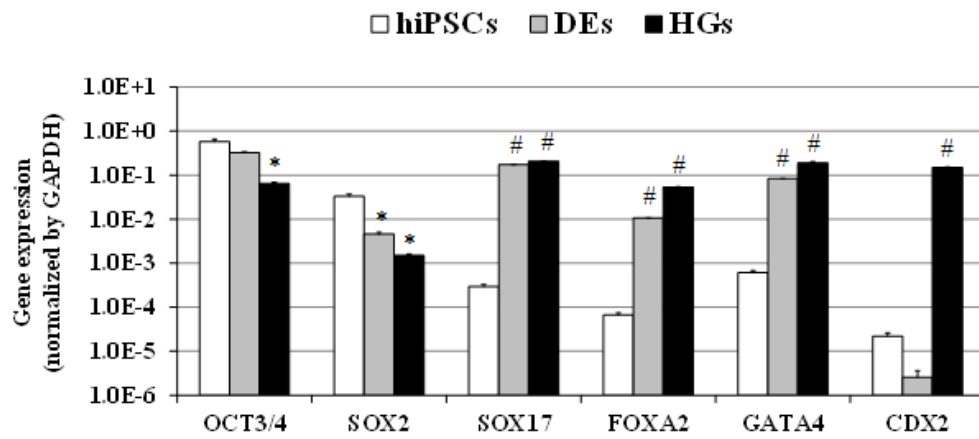
S 及び V は, 小腸の単位長さあたりの消化管の表面積及び体積を表し, t_{res} は薬物の小腸内平均滞留時間 (一定) を表す.

iPS 小腸の膜透過係数 (P_{app}) とヒト Fa 値の相関 (Table 4-2, Figure 4-8) から, スケーリングファクター (SF) を算出すると, $SF = 2.96$ となった. つまり, iPS 小腸の膜透過性からヒト Fa を予測する式は以下のようなになる.

$$\text{Fa} = e^{-2.96 \times P_{\text{app}}} \quad (\text{Eq. 4-3})$$

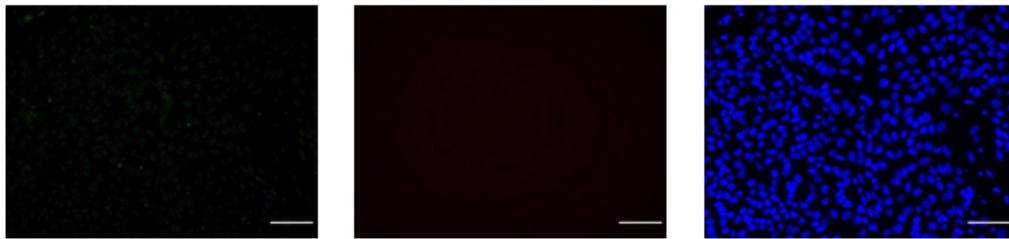
ヒト Fa 値について、上述の式に基づいて予測した値と臨床実測値について回帰統計を行った結果、決定係数は 0.691 であり、 P_{app} からヒト Fa 値を予測することの妥当性が示唆された (Table 4-2).

A

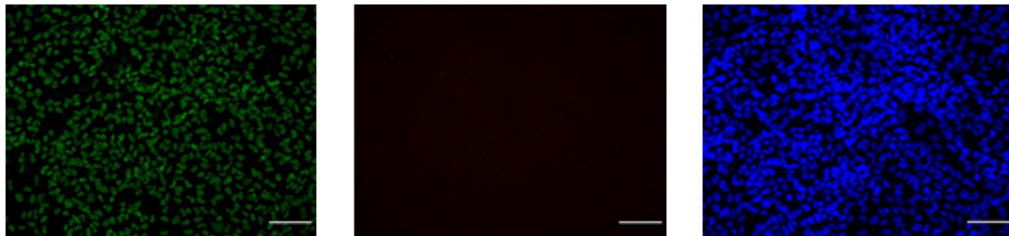


B **SOX17/CDX2/Hoechst 33342**

hiPSCs



DEs



HGs

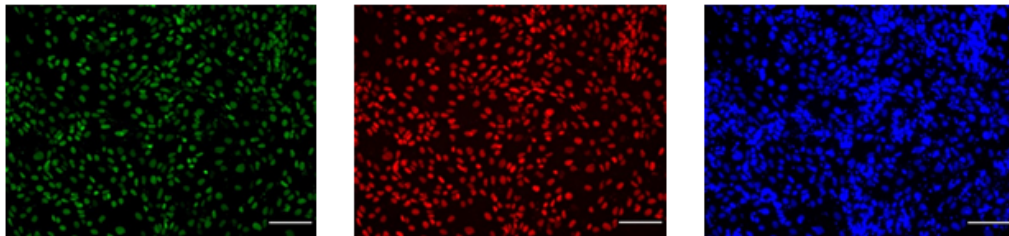


Figure 4-1. Marker expressions in hiPSCs, differentiated DEs, and HGs. HiPSCs were cultured in the presence of Activin A for 3 days to differentiate DEs, and then the DEs

was cultured in the presence of Wnt3a and FGF4 for 4 days to differentiate HGs. (A) Gene expression levels of undifferentiated markers (OCT3/4 and SOX2), DE markers (SOX17, FOXA2, and GATA4), a HG marker (CDX2) in hiPSCs, DEs, and HGs. Total RNA of each cell was extracted at each differentiated stage. Gene expression levels of markers were determined by qPCR analysis. Gene expression level of each marker was normalized by that of GAPDH and the relative expression ($2^{-\Delta C_t}$) calculated as described in the Experimental Section. Each data item represents the means (\pm S.E.M.) of triplicate analyses in a single sample. * and # indicate significant difference of the quantitative value compared with hiPSCs (* $p < 0.05$; # $p < 0.01$). (B) Immunofluorescence analysis of SOX17 and CDX2 in hiPSCs, DEs, and HGs. Left (green), middle (red), and right (blue) panel showed staining of SOX17, CDX2 and Hoechst 33342, respectively. Scale bar represents 100 μ m.

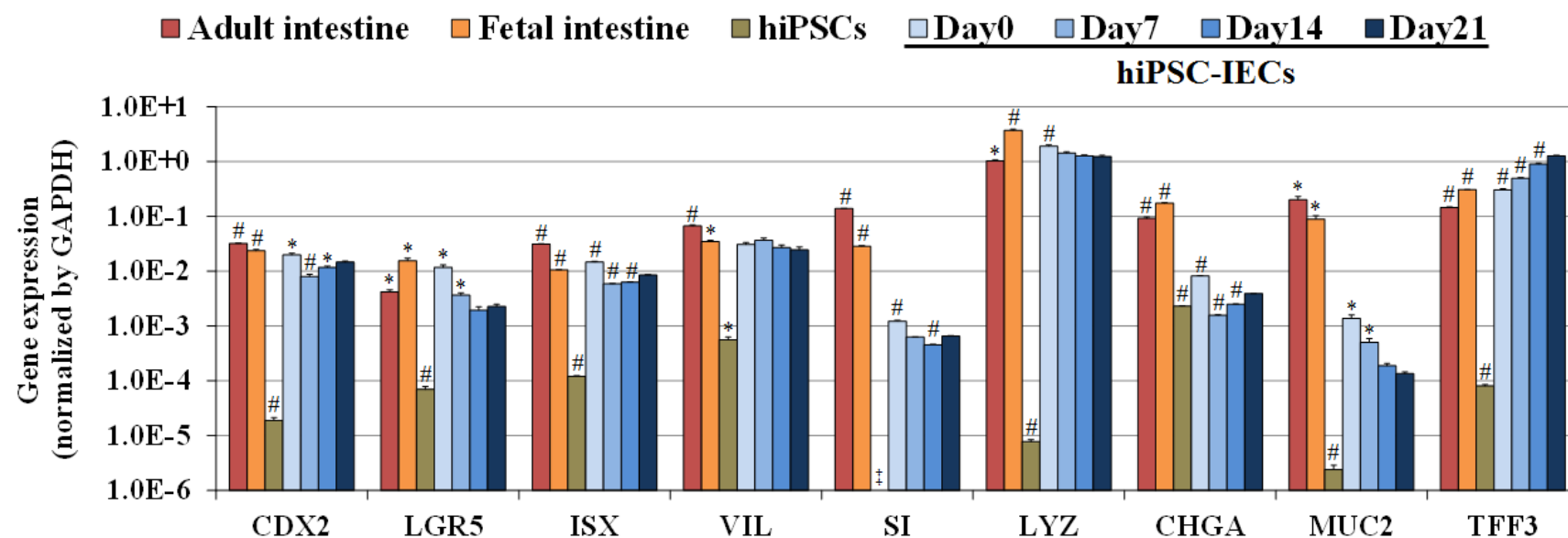


Figure 4-2. Gene expression levels of intestinal markers in adult small intestine, fetal small intestine, hiPSCs, and hiPSC-IECs. The gene expression levels of intestinal markers in adult small intestine (adult intestine), fetal small intestine (fetal intestine), hiPSCs, and hiPSC-IECs were examined by qPCR analysis as described in the Experimental Section. The total RNAs of adult intestine and fetal intestine were purchased from Clontech and BioChain Institute Inc., respectively. The total RNAs of hiPSCs and hiPSC-IECs were isolated using PureLink® RNA Mini Kit. hiPSC-IECs were cultured on Transwell inserts for defined periods; day 0 represents the cells before seeding on the Transwell insert, and day 7, day 14, and day 21 represent the cells cultured on the Transwell insert for 7, 14, and 21 days. The expression level of each gene was normalized by that of GAPDH, and the relative expression ($2^{-\Delta C_t}$) calculated as described in the

Experimental Section. Each data represents the means (\pm S.E.M.) of triplicate analyses in a single sample. * and # indicate significant difference of the quantitative value compared with day 21 (* $p < 0.05$; # $p < 0.01$). *The gene was not detected.

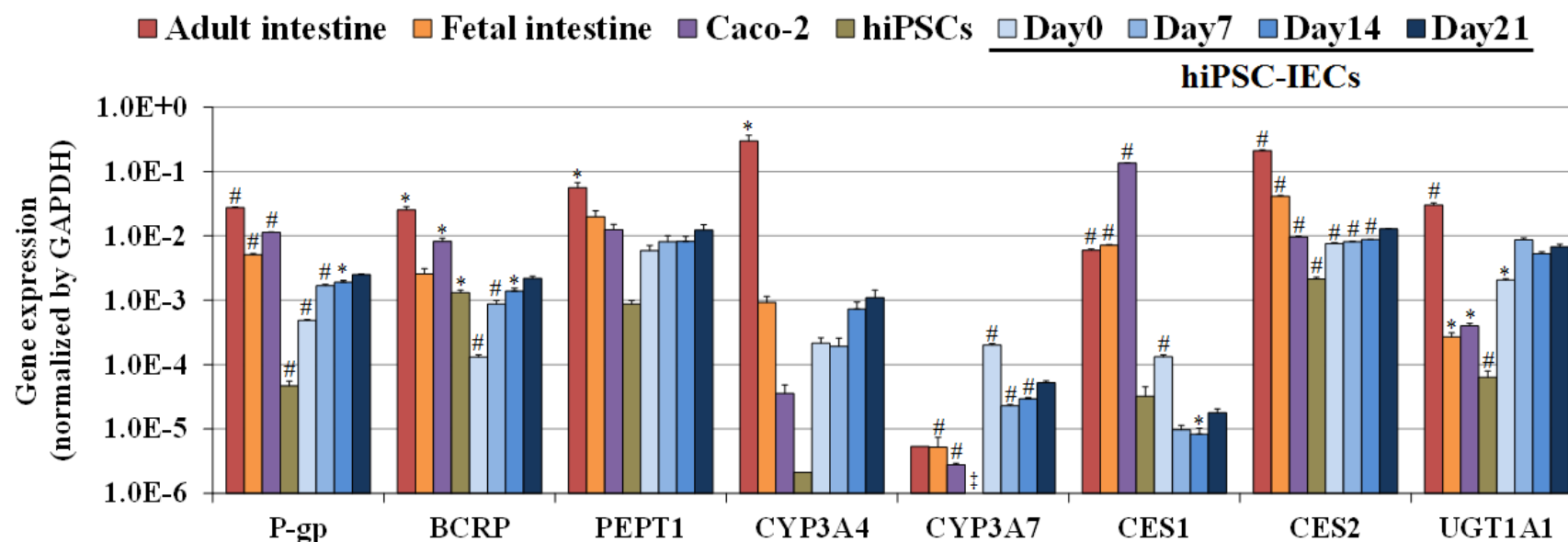


Figure 4-3. Gene expression levels of metabolic enzymes and transporters in adult small intestine, fetal small intestine, Caco-2 cells, hiPSCs, and hiPSC-IECs. The gene expression levels of metabolic enzymes and transporters in adult small intestine (adult intestine), fetal small intestine (fetal intestine), Caco-2 cells, hiPSCs, and hiPSC-IECs were examined by qPCR analysis as described in the Experimental Section. The total RNAs of adult intestine and fetal intestine were purchased from Clontech and BioChain Institute Inc., respectively. The total RNAs of Caco-2 cells, hiPSCs, and hiPSC-IECs were isolated using PureLink® RNA Mini Kit. Caco-2 cells were cultured on Transwell insert for 21 days, and hiPSC-IECs were cultured on Transwell inserts for defined periods; day 0 represents the cells before seeding on Transwell insert, and day 7, day 14, and day 21 represent the cells cultured on Transwell insert for 7, 14, and 21 days. The

expression level of each gene was normalized by that of GAPDH, and the relative expression ($2^{-\Delta Ct}$) was calculated as described in the Experimental Section. Each data point represents the means (\pm S.E.M.) of triplicate analyses of a single sample except for CYP3A4 in hiPSCs (n = 2) and CYP3A7 in adult intestine (n = 1). * and # indicate significant difference of the quantitative value compared with hiPSC-IECs 21 day after seeding on Transwell insert (*p < 0.05; #p < 0.01). ‡The gene was not detected.

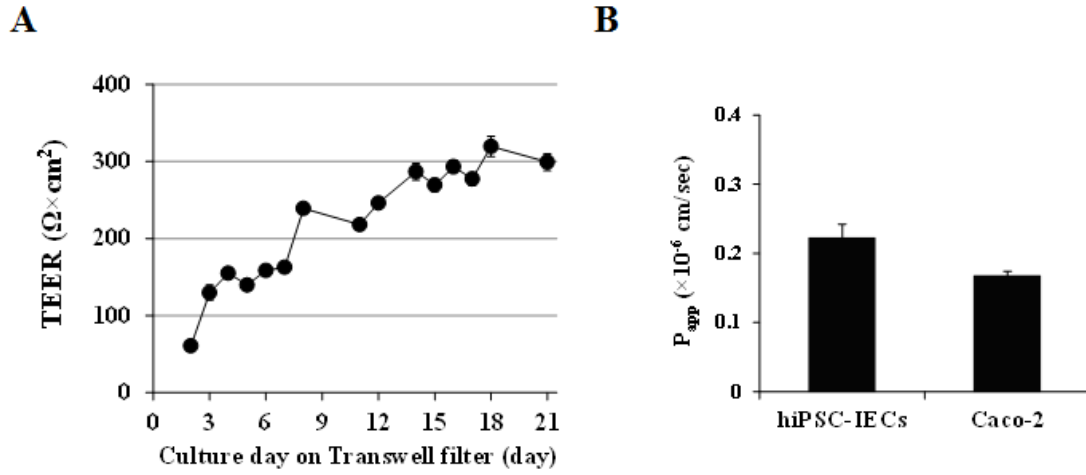


Figure 4-4. TEER values of hiPSC-IEC monolayers (A) and the P_{app} of $[^{14}\text{C}]$ mannitol in hiPSC-IEC and Caco-2 cell monolayers (B). (A) HiPSC-IEC monolayers were cultured on 24 well Transwell inserts for 21 days. The TEER values ($\Omega \times \text{cm}^2$) of hiPSC-IEC monolayers were determined as the product of the resistance (Ω) and the surface area of insert (0.33 cm^2). Each data item represents the mean (\pm S.E.M.) of six independent cells. (B) The P_{app} value of $[^{14}\text{C}]$ mannitol ($10 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{Ci/mL}$) in the apical-to-basolateral direction was measured in hiPSC-IEC and Caco-2 cell monolayers 21 day after seeding on Transwell inserts. Each data item represents the mean (\pm S.E.M.) of three independent experiments.

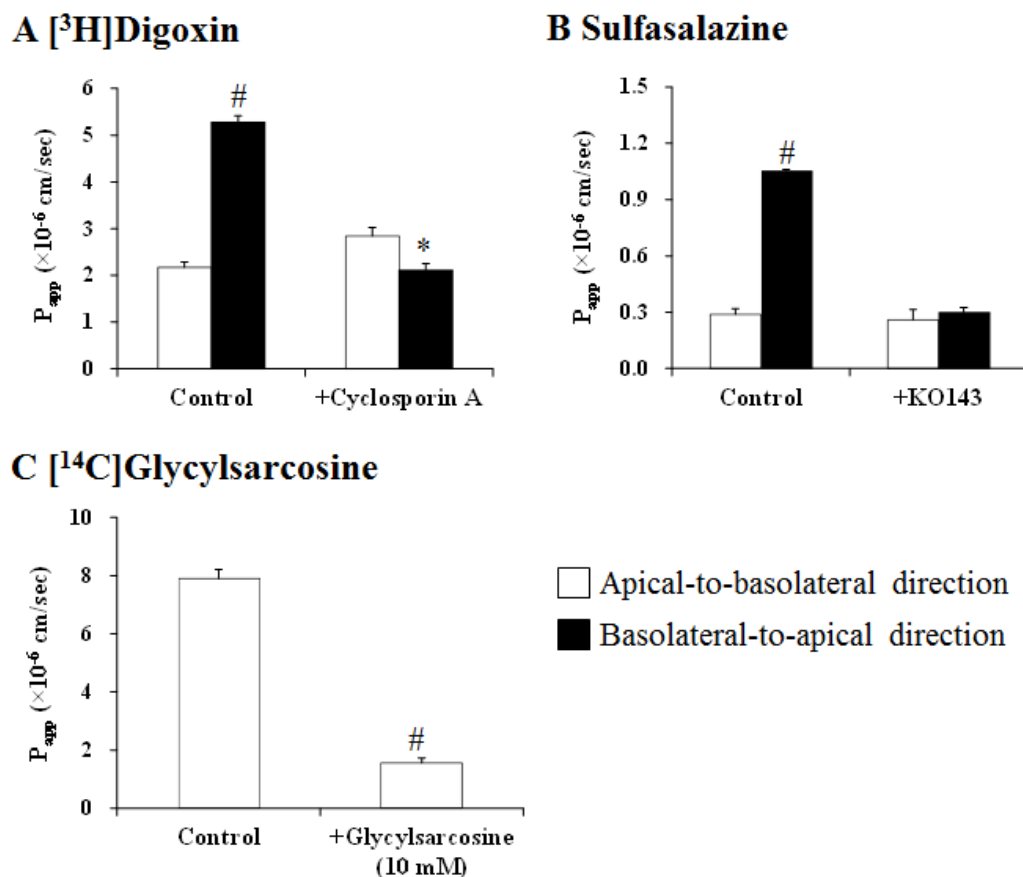
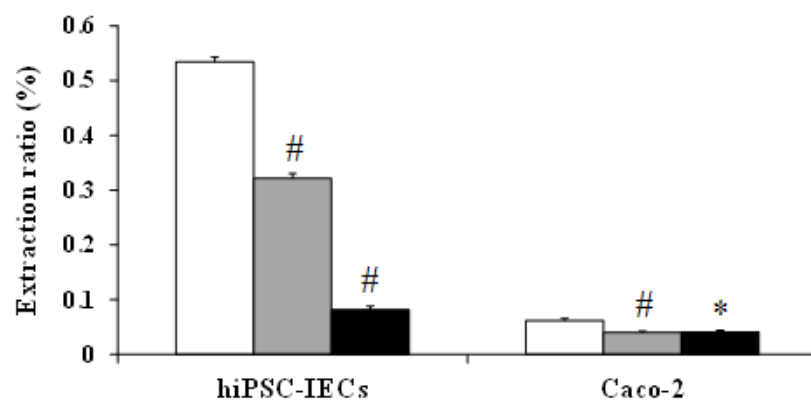


Figure 4-5. Transcellular transport of [³H]digoxin (A) and sulfasalazine (B), and [¹⁴C]glycylsarcosine (C) across hiPSC-IEC monolayers. (A) The P_{app} value of [³H]digoxin (1 μM, 1 μCi/mL) in the apical-to-basolateral (open column) and basolateral-to-apical directions (closed column) across hiPSC-IEC monolayers were measured in the absence (control) and presence of cyclosporin A (10 μM). * and # indicate significant difference of the P_{app} value in the basolateral-to-apical direction compared with that in the apical-to-basolateral direction (*p < 0.05; #p < 0.01). (B) The P_{app} value of sulfasalazine (2 μM) in the apical-to-basolateral (open column) and basolateral-to-apical directions (closed column) across hiPSC-IEC monolayers were measured in the absence (control) and presence of KO143 (0.1 μM). # indicates significant difference of the P_{app} value in the basolateral-to-apical direction compared with that in the apical-to-basolateral

direction ($^{\#}p < 0.01$). (C) The P_{app} value of [^{14}C]glycylsarcosine (10 μ M, 0.5 μ Ci/mL) in the apical-to-basolateral direction across hiPSC-IEC monolayers were measured in the absence (control) and presence of high concentration (10 mM) of unlabeled glycylsarcosine. Each data point represents the mean (\pm S.E.M.) of three independent experiments. $^{\#}$ indicates significant difference of the P_{app} value in the presence of unlabeled glycylsarcosine compared with that of control ($^{\#}p < 0.01$).

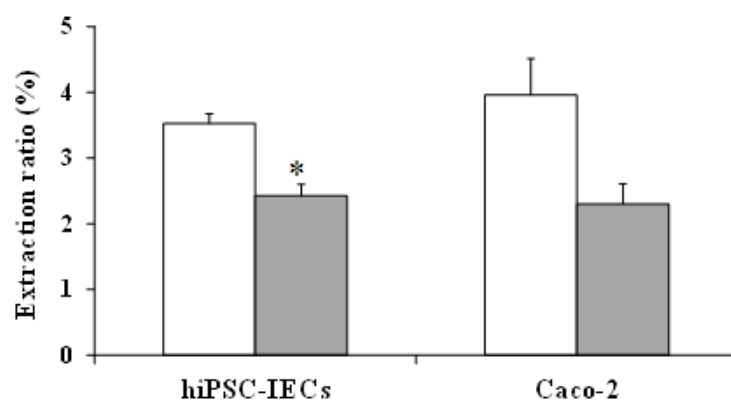
A Midazolam

□ Control ■ +Ketoconazole (0.5μM) ■ +Ketoconazole (10μM)



B Irinotecan

□ Control ■ +Telmisartan



C Temocapril

□ Control ■ +BNPP

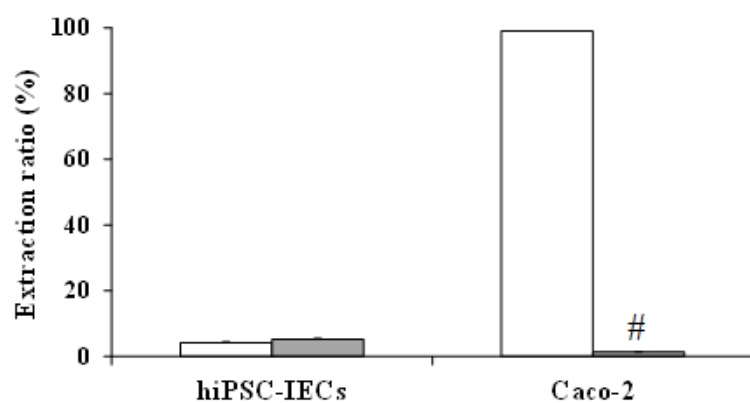


Figure 4-6. Metabolism of midazolam (A), irinotecan (B), and temocapril (C) in hiPSC-IEC and Caco-2 cell monolayers. The extraction ratio, a parameter of the contribution of metabolism to permeation across cell monolayers, was determined by means of apical-to-basolateral transcellular transport study in hiPSC-IECs and Caco-2 cells according to the description in the Experimental Section. (A) White, gray, and black columns represent extraction ratio of metabolism of midazolam (2 μ M) to 1-OH midazolam in the absence (control) and presence of ketoconazole (0.5 μ M and 10 μ M) in hiPSC-IECs and Caco-2 cells, respectively. (B) White and gray columns represent extraction ratio of metabolism of irinotecan (100 μ M) to SN38 in the absence (control) and presence of telmisartan (100 μ M) in hiPSC-IECs and Caco-2 cells, respectively. (C) White and gray columns represent extraction ratio of metabolism of temocapril (100 μ M) to temocaprilat in the absence (control) and presence of BNPP (500 μ M) in hiPSC-IECs and Caco-2 cells, respectively. Each data represents the mean \pm S.E.M. (n = 3). * and # indicate significant difference of the value of extraction ratio in the presence of inhibitor compared with that of control (*p < 0.05; #p < 0.01).

Table 4-1. Hydrolysis Activity in hiPSC-IEC Monolayers and Pharmacokinetic Parameters in Rats of Six Ester Prodrugs.

Compound	Transcellular transport study			PK study in rat		
	across hiPSC-IEC monolayers					
	CL _{int} (μL/min)			C _{max} (ng/mL)	AUC (ng×hr/mL)	BA (%)
Prodrug A	0.0239	±	0.0056	13.5	134.7	4.1
Prodrug B	0.632	±	0.040	141	1777	54.3
Prodrug C	0.655	±	0.037	59.4	730	22.3
Prodrug D	0.690	±	0.055	72.9	929	28.4
Prodrug E	1.11	±	0.06	104	1242	38.0
Prodrug F	1.66	±	0.13	172	2045	62.5

CL_{int}, a parameter of hydrolysis activity of ester prodrugs into the active form, was determined by means of the apical-to-basolateral transcellular transport study in hiPSC-IECs as described in the Experimental Section. The pharmacokinetic parameters (C_{max}, AUC, and BA) of six prodrugs in rats were calculated from the plasma concentrations of the active form after oral administrations of six prodrugs and intravenous administration of the active form. Six ester prodrugs and the active form are in-house compounds synthesized by Shionogi & Co., Ltd., and these six prodrugs are all hydrolyzed into the same active form. Each value of CL_{int} in hiPSC-IECs represents the mean

± S.E.M. of three determinations. Each value of C_{\max} , AUC, and BA in rat represents the mean of two or three rats.

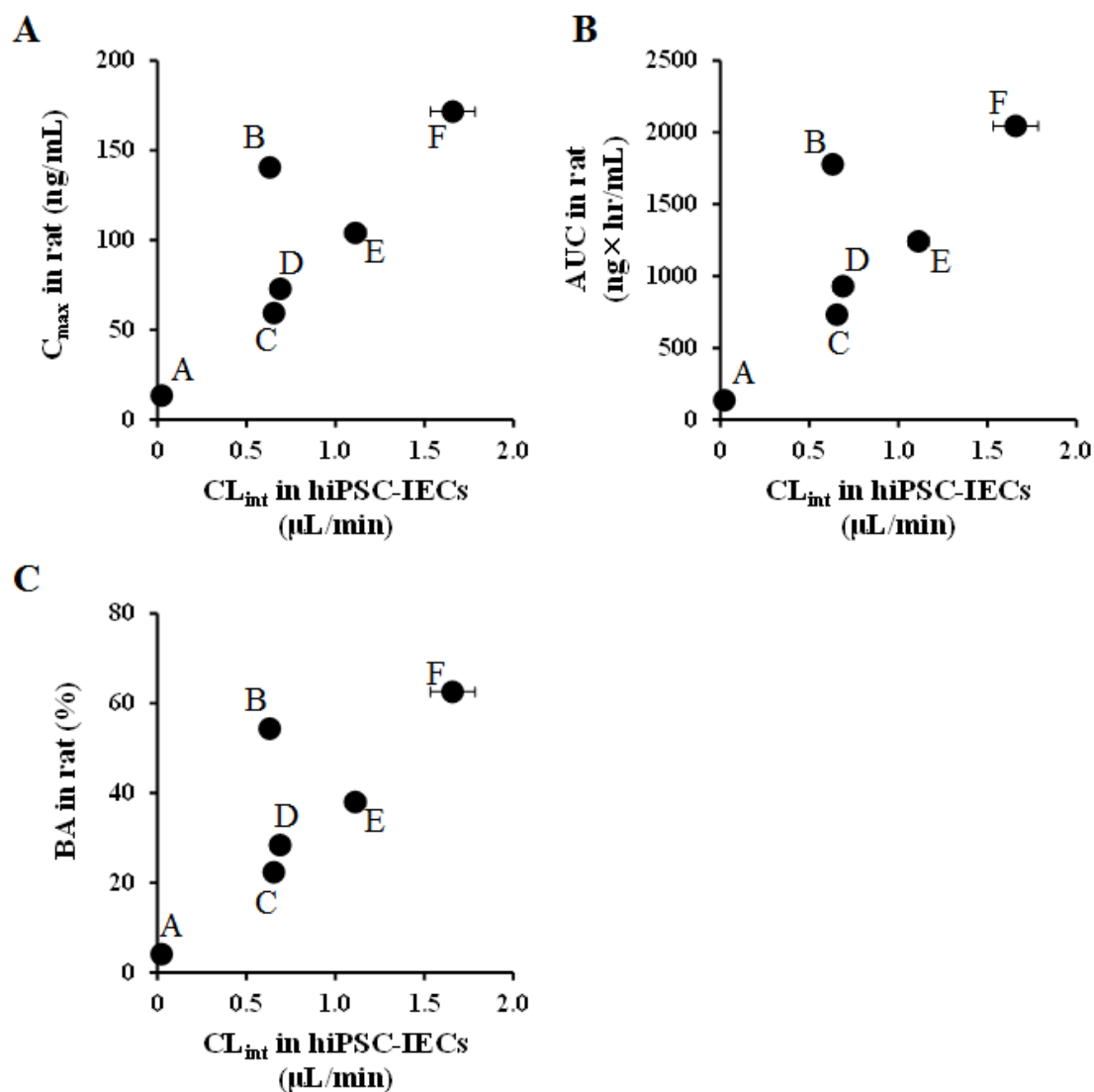
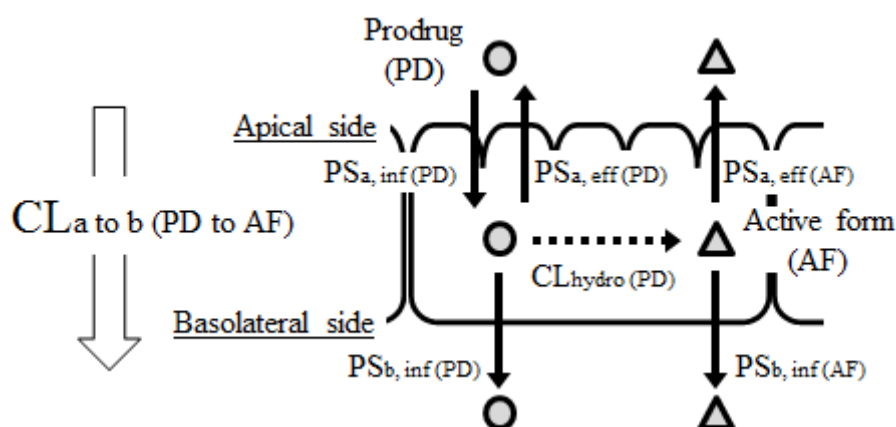


Figure 4-7. Comparison of hydrolysis activity of six ester prodrugs in hiPSC-IEC monolayers and pharmacokinetic parameters in rats. CL_{int} , a parameter of hydrolysis activity of ester prodrugs into the active form, was determined by means of the apical-to-basolateral transcellular transport study in hiPSC-IECs as described in the Experimental Section. The CL_{int} values of six ester prodrugs (prodrugs A, B, C, D, E, and F) in hiPSC-IECs were compared with the pharmacokinetic parameters, (A) C_{max} , (B) AUC, and (C) BA, in rats. These pharmacokinetic parameters of six prodrugs in rats were calculated from the plasma concentrations of the active form after oral administrations of six

prodrugs and intravenous administration of the active form. Six ester prodrugs and the active form are in-house compounds synthesized by Shionogi & Co., Ltd., and these six prodrugs are all hydrolyzed into the same active form. Each value of CL_{int} in hiPSC-IECs represents the mean \pm S.E.M. of three determinations. Each value of C_{max} , AUC, and BA in rat represents the mean of two or three rats.



Scheme 4-1. Schematic diagram illustrating behavior of a prodrug around intestinal epithelial cells. $CL_{a \text{ to } b} \text{ (PD to AF)}$ is defined as the conversion clearance from a prodrug in the apical side to its active form in the basolateral side through the permeation and hydrolysis in intestinal epithelial cells. PS product is also defined as the product of the permeability coefficient and the surface area of plasma membrane of per intestinal epithelial cell in the present study. $PS_{a, \text{ inf}} \text{ (PD)}$, $PS_{a, \text{ eff}} \text{ (PD)}$, and $PS_{b, \text{ eff}} \text{ (PD)}$ represent the PS product for the apical influx, apical efflux, and basolateral efflux of a prodrug, respectively. $PS_{a, \text{ eff}} \text{ (AF)}$ and $PS_{b, \text{ eff}} \text{ (AF)}$ represent the PS product for the apical efflux and basolateral efflux of the active form, respectively. $CL_{\text{hydro}} \text{ (PD)}$ represents the hydrolysis-mediated clearance of a prodrug into its active form in intestinal epithelial cell.

Table 4-2. Prediction of Human Fa of values 14 drugs from their P_{app} values across hiPSC-IEC monolayers.

Compound	P _{app} in hiPSC-IECs (×10 ⁻⁶ cm/sec)	Predicted Fa	Observed Fa			
			Median	Zhao et al. (2001)	Sugano et al. (2002)	Verma et al (2010)
Ganciclovir	0.0175 ± 0.0025	0.05	0.06	0.03	0.03	0.09
Doxorubicin	0.0758	0.20	0.12	0.007-0.23	Not examined	0.12
[¹⁴ C]mannitol	0.222 ± 0.020	0.48	0.16	0.16	0.16	Not examined
Famotidine	0.160 ± 0.030	0.38	0.38	0.38	0.38	Not examined
Sulpiride	0.0795 ± 0.0010	0.21	0.40	0.44	0.35	0.44
Atenolol	0.0972 ± 0.0016	0.25	0.50	0.50	0.50	0.50
Sulfasalazine	0.221 ± 0.027	0.48	0.59	0.56-0.61	Not examined	0.59
Furosemide	0.467 ± 0.098	0.75	0.61	0.61	0.61	0.61
Ranitidine	0.0637 ± 0.0026	0.17	0.64	0.39-0.88	0.50	0.65
Hydrochlorothiazide	0.474 ± 0.119	0.75	0.69	0.65-0.72	Not examined	Not examined
[³ H]digoxin	1.81 ± 0.04	1.00	0.81	0.81	Not examined	0.81
Acetaminophen	17.1 ± 0.4	1.00	0.90	0.80	0.80	1.00
Propranolol	39.3 ± 0.3	1.00	0.95	0.99	0.90	0.99

Antipyrine	23.9 ± 2.5	1.00	0.97	0.97	0.97	0.97
------------	------------	------	------	------	------	------

The P_{app} values of 14 drugs were determined by means of the apical-to-basolateral transcellular transport study across hiPSC-IECs. The data of doxorubicin represent the mean of duplicate experiments, and the data of 13 other drugs represent the mean \pm S.E.M. of triplicate experiments. Human F_a values were taken from the literature (Zhao et al., 2001; Sugano et al., 2002; Varma et al., 2010). If multiple F_a values are reported in these literatures, the median value was calculated and used. Correlation curve were given from the comparison between P_{app} values across hiPSC-IECs and observed human F_a values; $F_a = \exp(-2.96 \times P_{app})$. The predicted F_a values were calculated by using this equatisation.

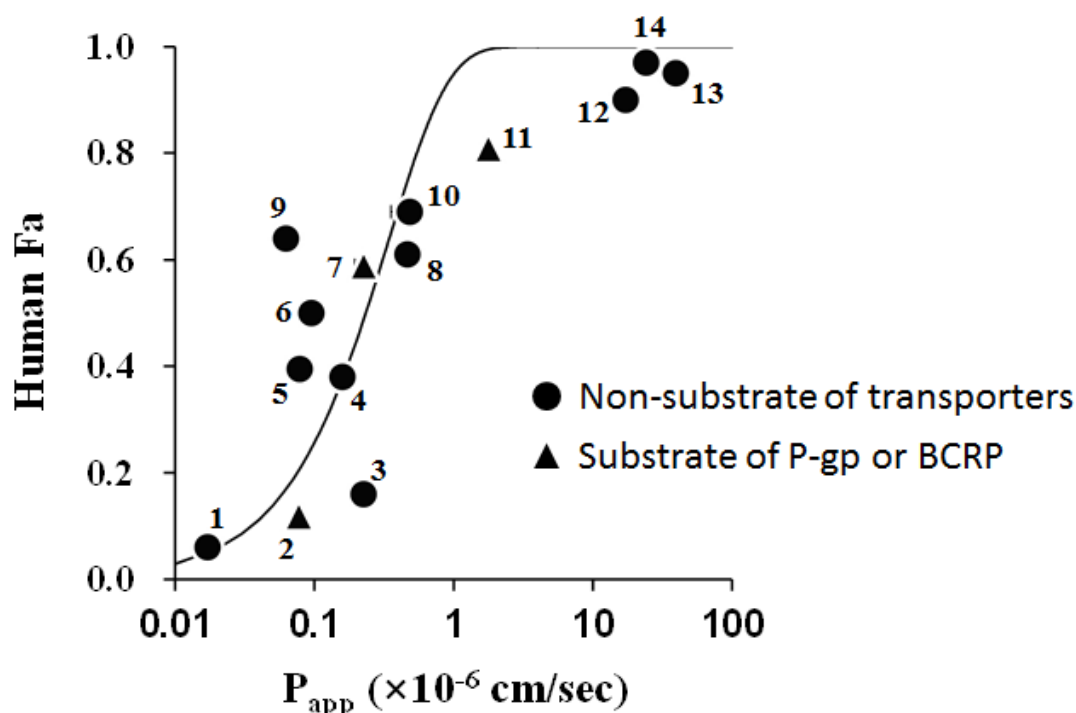


Figure 4-8. Comparison of P_{app} values of 14 drugs across hiPSC-IEC monolayers with their Fa values in humans. The P_{app} values of 14 drugs was determined by means of the apical-to-basolateral transcellular transport study across hiPSC-IECs. Ganciclovir, doxorubicin, [14 C]mannitol, sulfasalazine, and [3 H]digoxin were set at concentrations of 100 μ M, 2 μ M, 10 μ M (20 μ Ci/mL), 2 μ M, and 1 μ M (1 μ Ci/mL), respectively, and nine other drugs at 10 μ M. The data of doxorubicin represent the mean of duplicate experiments, and the data of 13 other drugs represent the mean \pm S.E.M. of triplicate experiments. 1, ganciclovir; 2, doxorubicin; 3, [14 C]mannitol; 4, famotidine; 5, sulpiride; 6, atenolol; 7, sulfasalazine; 8, furosemide; 9, ranitidine; 10, hydrochlorothiazide; 11, [3 H]digoxin; 12, acetaminophen; 13, propranolol; 14, antipyrine. Circle and triangle symbols represent non-substrate of transporters and substrate of P-gp or BCRP. Human Fa values were taken from the literature (Zhao et al., 2001; Sugano et al., 2002; Varma et al., 2010). If multiple Fa values are reported in these literatures, the median value was

calculated and used. The solid line represents the correlation curve between P_{app} values and Human F_a values; $F_a = \exp (-2.96 \times P_{app})$.

第3節 考察

これまで複数の研究機関によって iPS 小腸がトランスポーター及び代謝酵素の機能を示すことが報告されてきたが (Iwao et al., 2015; Ogaki et al., 2015; Ozawa et al., 2015; Kodama et al., 2016; Kabeya et al., 2017; Uchida et al., 2017), in vivo における小腸吸収性を iPS 小腸を用いた in vitro 試験から予測できるかは不明だった. 本研究では 1) エステル型プロドラッグ 6 化合物のラット in vivo 加水分解活性, 2) P-gp 基質薬 (doxorubicin 及び [³H]digoxin), BCRP 基質薬 (sulfasalazine) 及びそれらの非基質薬 11 化合物 (ganciclovir, [¹⁴C]mannitol, famotidine, sulpiride, atenolol, furosemide, ranitidine, hydrochlorothiazide, acetaminophen, propranolol 及び antipyrine) の計 14 化合物のヒト Fa 値について, iPS 小腸細胞の透過性から予測できる可能性が示唆された.

小腸上皮細胞間で形成されるタイトジャンクションは, パラセルラールートを介した透過を制限する機能を担っている. 既報では, パラセルラー透過マーカーである lucifer yellow の Caco-2 細胞における透過係数は, TEER 値が $200\ \Omega \times \text{cm}^2$ 以下の場合に高まるが, TEER 値が $200\ \Omega \times \text{cm}^2$ を超える場合は, 透過係数は TEER の値に寄らずほぼ一定となることが示されている (Hashimoto et al., 1994). この結果は, パラセルラールートを介した透過評価には, TEER 値が $200\ \Omega \times \text{cm}^2$ を超えることが必須であることを示唆している. 本研究では iPS 小腸の TEER 値は, トランズウェルインサートに播種して 21 日後に $299\ \Omega \times \text{cm}^2$ を示し (Figure 4-4A), またその時のパラセルラー透過マーカー [¹⁴C]mannitol の透過係数は, 強固なタイトジャンクションを形成する Caco-2 細胞 (TEER = $891\ \Omega \times \text{cm}^2$) と有意に変わらなかったことから (Figure 4-4B), iPS 小腸はパラセルラールートを介した透過評価に十分なタイトジャンクションを形成していることが示唆された.

さらに, iPS 小腸がトランスポーターの機能を有しているか確認した. 既報で

は、iPS 小腸は BCRP 及び PEPT1 の機能を有していることが報告されているが (Iwao et al., 2015; Ogaki et al., 2015; Ozawa et al., 2015; Kodama et al., 2016; Kabeya et al., 2017; Uchida et al., 2017), P-gp についてはこれまで報告例はなかった. iPS 小腸において, P-gp 基質の $[^3\text{H}]$ digoxin は, 頂端膜から基底側膜方向よりも基底側膜から頂端膜方向で膜透過性が高く, efflux ratio は 2.43 と算出された (Figure 4-5A). その efflux ratio は阻害剤の cyclosporin A によって低下したことから, iPS 小腸では P-gp の機能を有していることが示された. Ussing chamber システムを用いたヒト空腸における機能解析によれば, $[^3\text{H}]$ digoxin の efflux ratio はヒト空腸で 5.41 と報告されており (Sjoberg et al., 2013), 本研究よりも 2.23 倍高かった (Figure 4-5A). 本研究では iPS 小腸の P-gp の遺伝子発現量は成人小腸よりも 11.1 倍低いため (Figure 4-3), その差が iPS 小腸とヒト空腸の P-gp の排出活性の差に反映されたと推察される. また, P-gp に加えて BCRP 基質である sulfasalazine の排出輸送活性及び PEPT 基質である $[^{14}\text{C}]$ glycylsarcosine の取り込み輸送活性も認められている (Figure 4-5B, C). 従って, iPS 小腸は P-gp, BCRP 及び PEPT1 のようなトランスポーターの基質薬について, 小腸吸収性を評価できる可能性が示唆された.

iPS 小腸における CYP3A4 基質 midazolam から 1-OH midazolam への代謝活性は Caco-2 細胞のそれよりも高く (Figure 4-6A), iPS 小腸と Caco-2 細胞の CYP3A4 遺伝子発現量の差を反映した結果だった (Figure 4-3). しかし, iPS 小腸の CYP3A4 遺伝子発現量は成人小腸よりも 274 倍低いため, 活性についても同様にヒト小腸よりも低くなると推察される (Figure 4-3).

本研究では iPS 小腸はトランスポーター及び代謝酵素の発現がヒト小腸よりも低かった. 既報の RNA-sequencing によるクラスタリング解析によれば, iPS 小腸は成人小腸よりも胎児小腸に近いことが示唆されている (Finkbeiner et al., 2015). また, Miki らは, P-gp 及び CYP3A4 の発現は胎児よりも成人で高くなる

ことが示しており (Miki et al., 2005), iPS 小腸は未熟な性質であることが推察される。本研究では, トランズウェルインサート上で iPS 小腸を培養したところ, 培養前と比較して CYP3A4 の発現が高まり, 胎児型 CYP3A 分子種として認識されている CYP3A7 の発現が低くなる傾向にあった (Figure 4-3) (Shin et al., 2009; Betts et al., 2015). ヒト肝臓では CYP3A7 が成人でも発現し, 老化と共にその発現が高まることが報告されているため (Ohtsuki et al., 2012), CYP3A7 が高発現することが胎児型であるとは限らないが, 少なくともトランズウェルインサート上での培養は, iPS 小腸の CYP3A4 発現を高めるのに有効であると示唆される。しかし, その条件においてもトランスポーター及び代謝酵素の発現量は成人小腸よりも極めて低いため, それらの発現及び機能をより生体に近づけるために更なる培養条件及び細胞作製条件の改善が必要である。

CES はエステル型プロドラッグの加水分解に関与する酵素である。CES にはヒトで主に CES1 及び CES2 の 2 つの分子種が存在し, ヒト小腸では CES2 が主に発現している (Hosokawa, 2008). 一方, Caco-2 細胞においては, CES2 よりも CES1 の方が高発現しており, Caco-2 細胞ではヒト生体小腸の加水分解を反映していないことが種々報告されている。Imai らは CES1 基質の temocapril の加水分解活性が Caco-2 細胞お S9 画分では観察されるが, ヒト小腸ミクロソームでは検出できないことを報告している (Imai et al., 2005). また, Ishiguro らは, CES1 基質の dabigatran etexilate の小腸吸収は Caco-2 細胞を使用した場合に, CES1 を介した加水分解の寄与を過大評価することを示している (Ishiguro et al., 2014). 本研究では, iPS 小腸における CES2 の遺伝子発現及び機能は Caco-2 細胞に比較的近いが, CES1 の発現及び機能は iPS 小腸よりも Caco-2 細胞で極めて高いことがわかった (Figure 4-6B, C). 従って, iPS 小腸は Caco-2 細胞と比較して, CES1 を介した加水分解活性の影響を受けずに, 小腸における CES2 を介した加水分解活性を評価できる細胞系として有用である可能性が示唆された。

本研究では *in vivo* 小腸での加水分解活性が iPS 小腸を用いて評価できるか調べるため、エステル型プロドラッグ 6 化合物について、iPS 小腸での加水分解活性について、それらをラットに経口投与した際の活性体の血漿中暴露量 (C_{max} , AUC 及び BA) と比較した (Table 4-1, Figure 4-7). CL_{int} は、プロドラッグから活性体への加水分解活性を反映し、プロドラッグの加水分解性が高いほど、 CL_{int} の値は高くなるが、iPS 小腸におけるプロドラッグ 6 化合物の CL_{int} の値は、ラットにおける上述の PK パラメータと良好に相関した (Table 4-1, Figure 4-7). Scheme 4-1 で示すように、iPS 小腸におけるプロドラッグの CL_{int} は、薬物速度論に基づく 1) プロドラッグが細胞内に移行する過程、2) 細胞内でプロドラッグが活性体に加水分解される過程の 2 つの過程を反映している (Eq. 6-9). 一方で、小腸におけるプロドラッグの吸収過程にはこれらの 2 つの過程に加えて、3) 細胞内で生成した活性体が門脈中に流入する過程が含まれる (Eq. 6-10). 本研究で評価したプロドラッグ 6 化合物は、全て共通の活性体に加水分解されるため、細胞内で生成した活性体が細胞外に移行する速度は、6 つのプロドラッグ間で理論的に等しい (Eq. 6-11). 従って、本研究で使用した 6 つのプロドラッグ間での比較においては、iPS 小腸の CL_{int} の値は、プロドラッグの小腸吸収過程のうち、上述の 1) と 2) の過程だけでなく、3) の過程も反映しているため、 CL_{int} の値を用いても *in vivo* における加水分解活性と相関したと考えられる. これらのプロドラッグ 6 化合物に関してヒトとラットの加水分解活性の種差に関しては不明であるが、iPS 小腸におけるプロドラッグの CL_{int} は、活性体が共通のプロドラッグ間の比較において、*in vivo* の加水分解活性を評価するのに有用なパラメータとなる可能性がある. 今後更なる検討として、iPS 小腸の加水分解活性がヒト小腸の加水分解活性を反映するかを確認する必要がある.

iPS 小腸はタイトジャンクションを形成し、トランスポーターの活性を有していたことから、P-gp 基質薬 (doxorubicin 及び [3H]digoxin), BCRP 基質薬

(sulfasalazine) 及びそれらの非基質薬 11 化合物 (ganciclovir, [¹⁴C]mannitol, famotidine, sulpiride, atenolol, furosemide, ranitidine, hydrochlorothiazide, acetaminophen, propranolol 及び antipyrine) の計 14 化合物 の iPS 小腸における透過性とそれらのヒト Fa 値を比較ところ、それらは良好に相関したことから (Figure 4-8), 受動拡散を介して吸収される薬物だけでなく, P-gp 及び BCRP を介した排出輸送の影響を受ける薬物に対しても, iPS 小腸の膜透過性からヒト小腸吸収性を予測できる可能性が示唆された. 予測された Fa 値と実測値を比較すると, Ranitidine は 3 倍以上過小評価され, [¹⁴C]mannitol は 3 倍以上過大評価された (Table 4-2). 予測値と実測値が乖離した場合, トランスポーターの関与が考えられるが, Sugano らの行った PAMPA によれば, これらの化合物は良好に予測できている (Sugano et al., 2002). この結果から, この 2 化合物は受動拡散によって Fa 値が決定される化合物群であることが示唆され, 消化管吸収に対するトランスポーターの関与は低いと推察される. これらの化合物が予測から外れた原因については, 今後評価化合物数を増やして精査する必要がある.

結論として, 本研究では, 既報 (Spence et al., 2011) に従って作製した iPS 小腸は, 薬物の小腸吸収に必須の機能であるタイトジャンクションの形成能, トランスポーター, 代謝酵素の機能を有していることが示された. また, iPS 小腸におけるプロドラッグ 6 化合物の活性体への加水分解活性は, ラット in vivo 加水分解活性と相関し, P-gp 基質薬 (doxorubicin 及び [³H]digoxin), BCRP 基質薬 (sulfasalazine) 及びそれらの非基質薬 11 化合物 (ganciclovir, [¹⁴C]mannitol, famotidine, sulpiride, atenolol, furosemide, ranitidine, hydrochlorothiazide, acetaminophen, propranolol 及び antipyrine) の計 14 化合物の iPS 小腸透過性はヒト Fa 値と相関した. しかし, 現状では iPS 小腸における CYP3A4 の遺伝子発現量はヒト成人小腸の約 1/200 以下であることが課題である. 受動拡散及びトランスポーターの影響が反映される Fa 値だけでなく, 小腸代謝の影響を含んだ Fa ×

Fg 値についても予測できるようになるためには, CYP3A4 の発現を高めるような更なる細胞作製条件の改善が必要である.

第5章 結論及び展望

本研究では、創薬研究における実験動物からのヒト動態予測の限界に対し、種差の影響を回避した *in vitro* 試験系に基づいた小腸吸収予測によって打開し、非臨床試験で高確度にヒト臨床動態を予測するという薬物動態研究における究極的課題を解決することを目標とした。その目標に対して本研究では、1) 小腸におけるトランスポーター及び代謝酵素のタンパク質発現量を測定し、その発現量情報に基づき、小腸 P-gp/MDR1a の輸送活性を *in vitro* 試験系から再構築可能か検証すること、2) iPS 小腸におけるトランスポーター及び代謝酵素活性が *in vivo* 吸収特性を反映するか明らかにすることを目的とした。

第2章では、マウス、サル及びヒト小腸におけるトランスポーター、CYP 及び UGT のタンパク質発現量の種差を明らかにした。頂端膜の薬物排出トランスポーター (P-gp, BCRP 及び MRP2) の中では、サル及びヒト小腸では BCRP が最大の発現を示し、マウス小腸では MDR1a が bcrp よりも高発現することが明らかとなった。また代謝酵素の中では、UGT1A1 及び 1A6 がヒトとサル間で最大の発現量種差を示し、ヒトよりもサルの方が高発現することが明らかとなった。これまで UGT では基質薬の小腸抱合代謝に種差があることが知られていたが、基質認識性が広く1つの薬物に対して複数の UGT 分子種が抱合代謝に関与するため、UGT 基質を用いた抱合代謝試験からではどの分子種が種差の原因であるか不明であった。しかし本研究により、UGT1A1 及び 1A6 の基質は、ヒトよりもサルの方が小腸における抱合代謝の影響が大きいことが推察される。新薬開発の非臨床試験では、リコンビナント発現系を用いた基質試験により、候補化合物の小腸吸収に影響するトランスポーター及び代謝酵素の分子種が特定される。本研究で示したタンパク質発現量の種差の情報は、候補化合物を基質とする各トランスポーター及び代謝酵素について、それらの活性が実験動物とヒト間で種差を生じる可能性があるか推定する上で有用な情報になると期待される。

第3章では、マウス小腸における *mdr1a* の輸送活性 (*in situ* $PS_{a \rightarrow b}$ ratio) について、*in vitro* 試験における輸送活性を、タンパク質発現量に基づいて *in vitro* から *in vivo* へ外挿することで *in vivo* 小腸の *mdr1a* 輸送活性を再構築した。過去に Uchida らは、マウス BBB における *mdr1a* 輸送活性について、脳毛細血管内皮細胞及び L-*mdr1a* 細胞の *mdr1a* タンパク質発現量を用いて L-*mdr1a* 細胞での輸送活性から再構築することに成功している。その手法では、全細胞抽出液における *mdr1a* 発現量を用いているが、1) *mdr1a* が機能する場合は細胞膜であるため、*in vitro* の活性を *in vivo* に外挿するための *in vivo/in vitro* 発現量比は細胞膜における値が相応しいこと、2) BBB とは異なり小腸での再構築では、単位細胞に含まれる細胞膜量が *in vivo* と *in vitro* で異なると考えられるため、*in vitro* 輸送活性を *in vivo* に外挿するための *mdr1a* 発現量比は、全細胞抽出液ではなく細胞膜画分における値を用いなければ再構築できないこと、の2点を考慮し、本試験では細胞膜画分における発現量を使用した理論式を構築した。その結果、*mdr1a* 基質薬6化合物 (quinidine, digoxin, loperamide, vinblastine, verapamil 及び dexamethasone) 及び非基質薬1化合物 (diazepam) の計7化合物について、再構築した値は、Adachi らが報告した実測値と2.1倍以内の範囲で一致した。本再構築の手法は *in vivo* と *in vitro* で *mdr1a* の単分子輸送活性が等しいという仮定に基づくため、少なくとも健常マウスにおいて、*mdr1a* の単分子輸送活性は、表面積が異なる小腸及び L-*mdr1a* 細胞間で変わらないことが示唆された。病態時には、P-gp/*mdr1a* の単分子輸送活性の変動が報告されているが (Hartz et al., 2006), LC-MS/MS を用いたタンパク質発現量解析は、リン酸化のような翻訳後修飾の有無も区別してタンパク質発現量を算出することが可能である。従って、病態によって単分子輸送活性が変動した場合でも同様に再構築が可能であるか、今後検討する必要がある。また、本手法をヒトや P-gp 以外のトランスポーター及び代謝酵素、さらにはヒト小腸に対してにも適応することで、ヒト小腸吸収に対するトランス

ポーター及び代謝酵素の影響について、*in vitro* 試験から定量的に予測することが可能になると期待される。候補化合物が小腸トランスポーター及び代謝酵素の基質となる場合、併用薬との DDI によってそれらの機能が阻害され、候補化合物の小腸吸収性が変動することで、予期せぬ薬効減弱や副作用発現が起こる場合がある。本研究で示した再構築の手法を活用することで、DDI の懸念の少ない化合物を開発早期の段階で *in vitro* 試験に基づいて選抜できると期待される。

第 4 章では、小腸吸収性を *in vitro* 試験から予測するために、iPS 小腸が *in vivo* 小腸吸収性を反映するか検討した。その結果、既存の吸収評価系である Caco-2 細胞では困難であったプロドラッグの加水分解性評価に関して、iPS 小腸でのプロドラッグ加水分解活性がラット *in vivo* での加水分解活性と相関することが示された。現状ではラット *in vivo* に対する相関性のみの確認であるため、ヒト *in vivo* に関しても相関性が得られるか調べる必要がある。さらにトランスポーターの基質薬を含む化合物群に対して、iPS 小腸細胞透過性がヒト Fa 値と相関することが示された。一方、iPS 小腸では、小腸の主要な代謝酵素である CYP3A4 の発現が生体と比べて低い。そのため現状では、受動拡散及びトランスポーターの影響が反映される Fa 値を予測するまでに留まっていることが課題であるが、より最適な細胞作製条件の検討により CYP3A4 の発現を高めることができれば、小腸代謝の影響を加味した $Fa \times Fg$ 値を予測できる可能性がある。

本研究は、*in vitro* と細胞表面積が異なる小腸においても、*in vitro* と *in vivo* の単分子輸送活性が等しいという仮定に基づき、P-gp の排出活性を再構築することができた。さらに iPS 小腸における加水分解活性及び受動拡散/トランスポーターを介した細胞透過性は、*in vivo* 小腸吸収特性を反映することが示唆された。従って、本研究の知見は、*in vitro* 試験からの消化管吸収予測研究に対して新たな発展をもたらす成果であると考えられる。

第 6 章 実験の部

第 1 節 定量的プロテオミクスを用いたマウス，サル及びヒト小腸上皮細胞のトランスポーター及び代謝酵素のタンパク質発現量の種差の解明

実験材料

定量に用いた標準及び安定同位体標識ペプチドは，過去の文献 (Kamiie et al., 2008) で記載された *in silico selection criteria* に従って選抜し，Thermo Electron Corporation (Sedanstrabe, Germany) によって 95%以上の純度で合成されたものを使用した．ペプチド溶液の濃度は，HPLC-UV システム (Lachrom Elite, Hitachi, Tokyo, Japan) によるニンヒドリンポストカラム誘導体化法による定量アミノ酸分析法によって決定した．その他の試薬については，特に記載が無い限り，いずれも市販の特級品を用いた．

小腸検体

マウス

9-10 週齢のオスの ddY 系マウス 10 匹を日本 SLC (Hamamatsu, Japan) から購入し，東北大学大学院 薬学研究科動物舎で自由に水及び標準固形飼料 CRF-1 (Charles River, Yokohama, Japan) を摂取させ，12 hr の明/暗サイクルの温度制御された環境で飼育した．実験 16 hr 前に絶食させ，水のみを摂取させた．マウスは，pentobarbital (25.9 mg/kg weight) の麻酔下で屠殺し，十二指腸，空腸及び回腸を摘出した．十二指腸は，幽門部終点から下部 5 cm を十二指腸として定義し，摘出した．空腸及び回腸は，十二指腸を除く小腸のうち，最初の 5 分の 2 を空腸，残り 5 分の 3 を回腸として定義し摘出した．実験動物の取り扱いについては，東北大学大学院 薬学研究科の動物実験委員会が作成した「実験動物取り扱いに関する指針」に従って行った．

サル

生後 4 年 3 ヶ月のオスのインドネシア産カニクイザル 1 匹を株式会社 新日本科学 (Kagoshima, Japan) から購入した。本カニクイザルは、東北大学大学院 薬学研究科 薬物送達学分野 伊藤 克彰 博士が BBB のトランスポータータンパク質発現量解析 (Ito et al., 2011) で用いたサルと同一個体を使用した。サル小腸摘出は、以下の方法に従い、株式会社 新日本科学によって行われた。サルは、pentobarbital (25.9 mg/kg weight) の麻酔下でヘパリンナトリウム加生理食塩液の全身灌流で脱血後、十二指腸、空腸及び回腸を摘出した。十二指腸は、幽門部終点から膵管開口部まで及び膵管開口部から前者と同じ長さまでを十二指腸として定義し、摘出した。空腸及び回腸は、十二指腸を除く小腸のうち、最初の 5 分の 2 を空腸、残り 5 分の 3 を回腸として定義し摘出した。摘出した十二指腸、空腸及び回腸を 5 cm の断片に切断し、本研究では最も中央部の断片を使用した。その後直ちに、液体窒素を用いて小腸を凍結後 -80°C で冷凍保存し、ドライアイス存在下で東北大学大学院 薬学研究科に送付した。到着後、上皮細胞を単離するまでの間、-80°C で冷凍保存した。本摘出試験は、株式会社 新日本科学の動物実験委員会の承認のもと、本委員会の動物実験倫理指針に従って行われた。

ヒト

ヒト小腸におけるトランスポーター及び代謝酵素のタンパク質発現量解析は、ヒト検体の個人差を考慮し、2 人のドナー由来の小腸を用いた。それぞれのドナー由来の凍結空腸及び回腸 (ドナー#1 由来空腸及び回腸, ドナー#2 由来空腸及び回腸) は、Analytical Biological Services 社 (Wilmington, DE, USA) から購入した。なお、空腸及び回腸のどの位置からサンプルを摘出したかは、購入元から情報を得られなかったため不明である。ドライアイス存在下で東北大学大学院 薬学研究科に送付され、到着後、上皮細胞単離するまでの間、-80°C で冷凍保存し

た．本研究は東北大学大学院 薬学研究科の倫理委員会の承認のもとに行った．

摘出小腸組織からの小腸上皮細胞の単離及びミクロソーム及び細胞膜画分の調製

小腸上皮細胞を単離するために、摘出した小腸組織を 1 cm の断片に切断後、既報 (Evans et al., 1971) を参考に、2 mM EDTA 及び 0.5 mM dithiothreitol を含んだ PBS 中で 1,000 rpm, 1 hr, 4°C の条件下で撹拌した．撹拌後の懸濁液は、210 μ m のナイロンメッシュフィルターを通過させ、小腸断片を除去した後、100,000 \times g, 40 min, 4°C の条件下で超遠心分離した．EDTA による上皮細胞の単離工程では、細胞が一部破碎されるため、超遠心分離で生成したペレットには上皮細胞に加えて細胞膜画分のような細胞構造断片も含まれる．上皮細胞だけであれば、一般的に 100-500 \times g のような比較的遅い速度での遠心分離によって回収可能であるが、本研究では漏出した細胞膜画分も含めて回収するため、100,000 \times g での超遠心分離を行った．本手法では得られたペレット中に破碎された細胞の構造断片が含まれるが、以下に示すように、引き続きテフロン製ホモジナイザーと窒素ガス細胞粉碎器で細胞を完全に破碎するため、超遠心分離操作を行っても得られる膜画分の純度に影響はないと考えた．超遠心分離で得られたペレットを hypotonic buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1% (v/v) protease inhibitor cocktails (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) で再懸濁し、回転 (1,000 rpm) させながら 15 回上下にストロークした．30 分間氷上で静置後、さらに回転 (1,000 rpm) させながら 20 回上下にストロークした．細胞懸濁液を窒素ガス細胞粉碎器に移し nitrogen cavitation 法 (450 psi, 15 min, 4°C) によって細胞を破碎した．細胞懸濁液を 10,000 \times g, 10 min, 4°C の条件下で遠心分離後、得られた上清を 10,000 \times g, 10 min, 4°C の条件下で再度遠心分離して上清を回収することによって、細胞デブリ

スを可能な限り除いた。得られた上清を $100,000 \times g$, 10 min, 4°C の条件下で超遠心分離し、得られたペレットをミクロソーム膜画分とし、氷冷した suspension buffer (250 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) で懸濁した。ミクロソーム膜画分の一部を 38% sucrose buffer (38% (v/v) sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) の上に重層し、 $100,000 \times g$, 10 min, 4°C の条件下で超遠心分離した。得られた中間層をシリンジ及びニードルを用いて回収し、 $100,000 \times g$, 10 min, 4°C の条件下で超遠心分離した。得られたペレットを細胞膜画分とし、氷冷した suspension buffer で懸濁した。ミクロソーム画分及び細胞膜画分のタンパク質濃度は、DC protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いた Lowry 法によって決定した。

還元アルキル化及び酵素消化

タンパク質懸濁液と等容積以上の alkylation buffer (7 M guanidine hydrochloride, 10 mM EDTA-Na, 0.5 M Tris-HCl, pH 8.5) を添加して計 220 μL とした。タンパク質量と等量の dithiothreitol を添加し 1 hr 攪拌後、タンパク質量の 2.5 倍量の iodoacetamide を添加し遮光下で 1 hr 攪拌した。次に methanol-chloroform 沈殿法により、タンパク質試料を回収した。氷冷した methanol 600 μL , chloroform 150 μL , 水 450 μL を順次添加し、スイングローターを用いて $17,360 \times g$, 3 min, 4°C の条件下で遠心分離した。上清を除去後、氷冷した methanol 450 μL を添加しスイングローターを用いて $17,360 \times g$, 3 min, 4°C の条件下で遠心分離した。上清を完全に除き、タンパク質試料を回収した。得られたタンパク質試料を 10 μL の 6 M urea (0.1 M Tris-HCl, pH 8.5) に溶解後、40 μL の 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) を添加した。含まれるタンパク質量の 1/100 量の lysyl endopeptidase (Wako, Osaka, Japan) 及び最終濃度 0.05% となるように protease MAX (Promega, Madison, WI, USA) を添加し、室温で 3 hr 静置した。その後、タンパク質量の 1/100 量の trypsin (prmega)

を添加し、37°C で 16 hr インキュベートした。

LC-MS/MS を用いたタンパク質発現量解析

酵素消化したペプチド試料に対して、一定量の安定同位体標識した内標準ペプチド混合溶液を添加した。また、検量線サンプルは、既知量の合成した標準ペプチドで希釈系列を作製し、それについてもサンプルと同量の内標準ペプチド混合溶液を添加した。最終濃度 1% となるように formic acid を添加後、17,360 × g, 5 min, 4°C の条件下で遠心分離し、その上清を LC-MS/MS に注入した。質量分析装置は、三連四重極型質量分析装置または Triple TOF5600 (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) を使用した。LC-MS/MS の装置条件の測定条件は、以下に示す通りである

三連四重極型質量分析装置を用いた測定条件

LC 装置は、Agilent 1100 HPLC system (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) を使用した。質量分析装置は、Turbo V ion source (AB SCIEX) を搭載した API5000 または QTRAP5500 (AB SCIEX) を使用した。移動相は、(A) 0.1% formic acid in water (B) 0.1% formic acid in acetonitrile を使用した。

40 µL のサンプルを HPLC 分析カラム XBridge BEH130 C18 (1.0 mm ID × 100 mm, 3.5 µm particles; Waters, Milford, MA, USA) に注入し、移動相 A 及び B を 50 µL/min の流速で次に示すグラジエント条件 [1% B; 5min (0-5 min), 1-60% B; 60 min (5-65 min), 60-100% B; 1 min (65-66 min), 100% B; 2 min (66-68 min), 100-1% B; 2 min (68-70 min), 1% B; 60 min (70-130 min)] で流し、分析カラムからの分離溶出を行った。

各標的ペプチドにつき、4 つの selected reaction monitoring (SRM) /multiple reaction monitoring (MRM) transition を設定し、1 回の測定につき、最大 37 分子を同時測定した。標的ペプチドの情報及び SRM/MRM 条件は Table 6-1 に記載し

た．クロマトグラムのピークデータは，Analyst ソフトウェア (AB SCIEX) を用いて解析した．

Triple TOF5600 を用いた測定条件

LC 装置は，cHiPLC nanoflex system (Eksigent Technologies, Dublin, CA, USA) を搭載した NanoLC-Ultra 1D plus system (Eksigent Technologies) を使用した．質量分析装置は，NanoSpray III ion source (AB SCIEX) を搭載した Triple TOF5600 を使用した．移動相は，(A) 0.1% formic acid in 98% water and 2% acetonitrile (B) 0.1% formic acid in 80% acetonitrile and 20% water を使用した．

10 μ L のサンプルをトラップカラム (Nano cHiPLC Trap column 200 μ m \times 0.5 mm ChromXP C18-CL 3 μ m 120 Å) (Eksigent Technologies) に注入し，移動相 A を 5 μ L/min の流速で 10 min (0-10 min) 流し，サンプルの脱塩及び目的成分の濃縮を行った．次に，トラップカラムの流路を Nano cHiPLC 分析カラム (Nano cHiPLC column 75 μ m \times 15 cm ChromXP C18-CL 3 μ m 120 Å) (Eksigent Technologies) の流路に切り替え，200 nL/min の流速で移動相 A 及び B を次に示すグラジエント条件 [2% B; 1 min (10-11 min), 10% B; 5 min (11-16 min), 10-50% B; 114 min (at 16 to 130 min), 50-90% B; 3 min (130-133 min), 90% B; 6 min (133-139 min), 90-2% B; 1 min (139-140 min), 2% B; 20 min (140-160 min)] で流し，トラップカラムからのペプチド溶出，分析カラムへの保持及び分析カラムからの溶出分離を行った．

標的ペプチドは，MRM- high resolution (MRM-HR) モード (parallel reaction monitoring) を用いて，Table 6-2 に記載した Q1 の m/z 値に基づいて，1 回の測定につき，20 ペプチド (標的ペプチド 10 分子及び安定同位体標識内標準ペプチド 10 分子) を同時測定した．クロマトグラムのピークデータの解析は，MultiQuant ソフトウェア (AB SCIEX) を用い，各分子につき生データから 4 つ

の SRM/MRM transition を抽出し、解析した。標的ペプチドの情報及び SRM/MRM 条件は Table 6-2 に記載した。

定量値及び定量限界値の算出方法

検量線は全ての SRM/MRM transition について、合成した検量線ペプチドと内標準ペプチドのクロマトグラムのピークエリア比を y 軸に、検量線に使用したペプチド量を x 軸にして作成した。測定分析では、1 つの標的ペプチドにつき、4 種の SRM/MRM transition をモニターしたが、3 つ以上の SRM/MRM transition でクロマトグラムのピークが検出された場合は、標的ペプチドと内標準ペプチドのピークエリア比と検量線からターゲットペプチド量 (fmol) を決定した。標的分子のタンパク質発現量 (fmol/ μ g plasma or microsomal membrane protein) は、各 SRM/MRM transition について、ターゲットペプチド量 (fmol) を定量分析に用いた膜タンパク質量 (μ g plasma or microsomal membrane protein) で割ることで算出した。各分子の発現量は、3 つもしくは 4 つの SRM/MRM transition におけるタンパク質発現量 (fmol/ μ g plasma or microsomal membrane protein) の平均値と標準偏差 (SEM) を算出し、平均値 \pm SEM で表した。

一方、4 種の SRM/MRM transition の中で、クロマトグラムのピークが検出された SRM/MRM transition が 2 つ以下であった場合、測定値は定量限界以下として、定量下限値を算出した。既報 (Uchida et al., 2011b; Uchida et al., 2015) に従い、サンプル中においてクロマトグラムのピークが得られなかった SRM/MRM transition の中で最も定量感度が高い transition を対象に、標的ペプチドのクロマトグラムのピークエリア値が三連四重極型質量分析装置を用いた測定では 5000 counts, Triple TOF5600 を用いた測定では 1000 counts となる時のターゲットペプチド量 (fmol) を算出し、以下の式に従って定量下限値 (limit of quantification; LQ) を算出した。

$$\frac{PA_{St}}{PA_{IS}} = \text{Slope} \times A_{St} + \text{Intercept} \quad (\text{Eq. 6-1})$$

$$A_{5000 \text{ or } 1000 \text{ in target sample}} = \frac{(5000 \text{ or } 1000 \text{ counts} / PA_{IS \text{ in target sample}} - \text{Intercept})}{\text{Slope}} \quad (\text{Eq. 6-2})$$

$$LQ = A_{5000 \text{ or } 1000 \text{ in target sample}} / \text{Target sample amount} \quad (\text{Eq. 6-3})$$

ここで、 PA_{St} 及び PA_{IS} は、それぞれ既知のペプチド量 (A_{St}) を測定した際に得られる標的ペプチド及び内標準ペプチドのクロマトグラムのピークエリア値を示す。Slope 及び Intercept は、それぞれ検量線の傾きと y 切片を示す。 $A_{5000 \text{ or } 1000 \text{ in target sample}}$ は、標的サンプル中でクロマトグラムのピークエリア値が 5000 counts (三連四重極型質量分析装置) または 1000 counts (Triple TOF5600) 得られる時のペプチド量を示す。 $PA_{IS \text{ in target sample}}$ は、標的サンプル中での内標準ペプチドのクロマトグラムのピークエリア値を示す。Target sample amount は、標的サンプルの膜タンパク質量 ($\mu\text{g plasma or microsomal membrane protein}$) を表す。

Table 6-1. Peptide Probes and SRM/MRM Transitions for Quantification of Mouse, Monkey, and Human Molecules by Using Triple Quadrupole Mass Spectrometer

Molecule	Genbank accession number	St or IS	Probe sequence	Number of AA	Position of		SRM/MRM transition (m/z)				
					stable isotope- labeled AA from the N terminal	Stable isotope- labeled AA					
<Mouse>											
ABC transporters											
abca1	NP_038482	St	FVSPLSWDLVGR ^a	12 ^a	-	-	688.4 ^a	1129.6 ^a	1042.6 ^a	832.4 ^a	945.5
		IS	FVSPLSWDLVGR ^a	12 ^a	9 ^a	L ^a	691.9 ^a	1136.6 ^a	1049.6 ^a	839.4 ^a	952.5
abcb1 / mdr1a	NP_035206	St	NTTGALTTR ^b	9 ^b	-	-	467.8 ^b	618.4 ^b	719.4 ^b	490.3	561.3 ^b
		IS	NTTGALTTR ^b	9 ^b	6 ^b	L ^b	471.3 ^b	625.4 ^b	726.4 ^b	497.3	568.3 ^b
abcb1 / mdr1b	NP_035205	St	EBVDEDVPLVSFWR ^b	14 ^b	-	-	831.4 ^b	1118.6	1003.6 ^b	904.5 ^b	807.5 ^b
		IS	EBVDEDVPLVSFWR ^b	14 ^b	12 ^b	F ^b	836.4 ^b	1128.6	1013.6 ^b	914.5 ^b	817.5 ^b
abcc1 / mrp1	NP_032602	St	TPSGNLVNR ^b	9 ^b	-	-	479.3 ^b	759.4 ^b	672.4 ^b	501.3	615.4 ^b

		IS	TPSGNLVNR ^b	9 ^b	6 ^b	L ^b	482.8 ^b	766.4 ^b	679.4 ^b	508.3	622.4 ^b
abcc2 / mrp2	NP_038834	St	VVGPNGLLSGK	11	-	-	520.8	404.3	574.4	785.5	842.5
		IS	VVGPNGLLSGK	11	11	K	524.8	412.3	582.4	793.5	850.5
abcc3 / mrp3	NP_083876	St	ILSALAEKG ^b	9 ^b	-	-	451.3 ^b	788.5 ^b	675.4 ^b	588.3 ^b	517.3
		IS	ILSALAEKG ^b	9 ^b	5 ^b	L ^b	454.8 ^b	795.5 ^b	682.4 ^b	595.3 ^b	524.3
abcc5 / mrp5	NP_038818	St	SLSEASVAVDR ^b	11 ^b	-	-	567.3 ^b	646.4 ^b	717.4 ^b	933.5 ^b	559.3
		IS	SLSEASVAVDR ^b	11 ^b	2 ^b	L ^b	570.8 ^b	646.4 ^b	717.4 ^b	933.5 ^b	559.3
abcc6 / mrp6	NP_061265	St	SLLWDVAR ^b	8 ^b	-	-	480.3 ^b	759.4 ^b	646.3 ^b	460.3 ^b	345.2
		IS	SLLWDVAR ^b	8 ^b	3 ^b	L ^b	483.8 ^b	766.4 ^b	646.3 ^b	460.3 ^b	345.2
abcg2 / bcrp	NP_036050	St	SSLDDVLAAR ^b	10 ^b	-	-	522.8 ^b	644.4 ^b	757.5 ^b	529.3 ^b	430.3
		IS	SSLDDVLAAR ^b	10 ^b	7 ^b	L ^b	526.3 ^b	651.4 ^b	764.5 ^b	536.3 ^b	437.3
abcg5	NP_114090	St	TTLLDAISGR ^b	10 ^b	-	-	523.8 ^b	844.5 ^b	731.4 ^b	618.3 ^b	503.3
		IS	TTLLDAISGR ^b	10 ^b	4 ^b	L ^b	527.3 ^b	851.5 ^b	738.4 ^b	618.3 ^b	503.3
abcg8	NP_080456	St	ASLLDVITGR ^b	10 ^b	-	-	522.8 ^b	660.4 ^b	545.3 ^b	446.3	773.5 ^b
		IS	ASLLDVITGR ^b	10 ^b	4 ^b	L ^b	526.3 ^b	660.4 ^b	545.3 ^b	446.3	780.5 ^b
SLC transporters											
slc3a2 / 4f2hc	NP_001154885	St	IGDLQAFVGR ^b	10 ^b	-	-	538.3 ^b	962.5	677.4 ^b	549.3 ^b	478.3 ^b
		IS	IGDLQAFVGR ^b	10 ^b	8 ^b	V ^b	541.3 ^b	968.5	683.4 ^b	555.3 ^b	484.3 ^b

slc5a1 / sgl1	NP_062784	St	ADSFHIFR	8	-	-	331.5	403.7	286.7	435.3	461.2
		IS	ADSFHIFR	8	8	R	334.8	408.7	291.7	445.3	466.2
slc6a6 / taut	NP_033346	St	EGATPFHSR ^b	9 ^b	-	-	501.2 ^b	643.3 ^b	546.3 ^b	399.2 ^b	262.2
		IS	EGATPFHSR ^b	9 ^b	6 ^b	F ^b	506.2 ^b	653.3 ^b	556.3 ^b	399.2 ^b	262.2
slc7a5 / lat1	NP_035534	St	VQDAFAAAK ^b	9 ^b	-	-	460.7	693.4 ^b	360.2	578.3 ^b	821.4 ^b
		IS	VQDAFAAAK ^b	9 ^b	7 ^b	A ^b	462.7	697.4 ^b	364.2	582.3 ^b	825.4 ^b
slc7a8 / lat2	NP_058668	St	GEFFWLEPK	9	-	-	576.8	672.4	819.4	373.2	966.5
		IS	GEFFWLEPK	9	6	L	580.3	679.4	826.4	373.2	973.5
slc10a2 / asbt	NP_035518	St	LAGQPWYR	8	-	-	495.8	877.4	806.4	621.3	524.3
		IS	LAGQPWYR	8	5	P	498.8	883.4	812.4	627.3	524.3
slc15a1 / pept1	NP_444309	St	TLPVFPGGNQVQIK	14	-	-	749.4	940.5	558.3	215.1	411.3
		IS	TLPVFPGGNQVQIK	14	14	K	753.4	948.5	558.3	215.1	411.3
slc16a1 / mct1	NP_033222	St	SITVFFK	7	-	-	421.2	641.4	294.2	441.3	540.3
		IS	SITVFFK	7	6	F	426.2	651.4	304.2	451.3	550.3
slc21a1 / oatp1	NP_038825	St	GVQHPLYGEK ^b	10 ^b	-	-	564.3 ^b	843.4 ^b	706.3 ^b	496.2 ^b	333.2
		IS	GVQHPLYGEK ^b	10 ^b	6 ^b	L ^b	567.8 ^b	850.4 ^b	713.3	496.2 ^b	333.2
slc21a2 / pgc	NP_201571	St	IFVDYGR ^c	7 ^c	-	-	435.2 ^c	756.4 ^c	609.3 ^c	510.2 ^c	395.2 ^c
		IS	IFVDYGR ^c	7 ^c	3 ^c	V ^c	438.2 ^c	762.4 ^c	615.3 ^c	510.2 ^c	395.2 ^c

slc21a5 / oatp2	NP_109612	St	EVATHGVR ^b	8 ^b	-	-	434.7 ^b	640.4 ^b	569.3 ^b	468.3 ^b	331.2 ^c
		IS	EVATHGVR ^b	8 ^b	7 ^b	V ^b	437.7 ^b	646.4 ^b	575.3 ^b	474.3 ^b	337.2 ^c
slc21a9 / oatp9	NP_780525	St	LYVDIDR	7	-	-	447.2	780.4	617.3	518.3	403.2
		IS	LYVDIDR	7	5	I	450.7	787.4	624.3	525.3	410.2
slc21a10 / oatp4	NP_065241	St	SVQPELK	7	-	-	400.7	614.4	486.3	389.2	260.2
		IS	SVQPELK	7	6	L	404.2	621.4	493.3	396.2	267.2
slc21a11 / oatp11	NP_076397	St	SGELQGDEAQR	11	-	-	595.3	675.3	803.4	503.3	916.5
		IS	SGELQGDEAQR	11	9	A	597.3	679.3	807.4	507.3	920.5
slc21a12 / oatp12	NP_683735	St	GAVSNPAFGK	10	-	-	474.3	720.4	633.3	519.3	351.2
		IS	GAVSNPAFGK	10	8	F	479.3	730.4	643.3	529.3	361.2
slc21a13 / oatp5	NP_076207	St	EENQGIK	8	-	-	465.8	672.4	558.4	430.3	373.3
		IS	EENQGIK	8	7	I	469.3	679.4	565.4	437.3	380.3
slc21a14 / oatp14	NP_067446	St	STVTQIER ^b	8 ^b	-	-	467.3 ^b	745.4	646.4 ^b	545.3 ^b	417.2 ^b
		IS	STVTQIER ^b	8 ^b	3 ^b	V ^b	470.3 ^b	751.4	646.4 ^b	545.3 ^b	417.2 ^b
slc21a17 / oatp17	NP_081860	St	LYVAQLSPSR	10	-	-	567.3	857.5	758.4	687.4	446.2
		IS	LYVAQLSPSR	10	8	P	570.3	863.5	764.4	693.4	452.2
slc21a18 / oatp18	NP_083218	St	FVASVPAPLLFR	12	-	-	658.9	1070.6	999.6	912.6	813.5
		IS	FVASVPAPLLFR	12	11	F	663.9	1080.6	1009.6	922.6	823.5

slc22a2 / oct2	NP_038695	St	LNPSFLDLVR	10	-	-	587.3	946.5	849.5	762.5	387.3
		IS	LNPSFLDLVR	10	8	L	590.8	953.5	856.5	769.5	394.3
slc22a3 / oct3	NP_035525	St	FLQGVFGK ^b	8 ^b	-	-	448.2 ^b	635.4 ^b	507.3 ^b	351.2	748.4
		IS	FLQGVFGK ^b	8 ^b	6 ^b	F ^b	453.2 ^b	645.4 ^b	517.3 ^b	361.2	758.4
slc22a6 / oat1	NP_032792	St	TSLAVLGK ^b	8 ^b	-	-	394.7	600.4 ^b	487.3 ^b	317.2	416.3 ^b
		IS	TSLAVLGK ^b	8 ^b	6 ^b	L ^b	398.2	607.4 ^b	494.3 ^b	324.2	423.3 ^b
slc22a7 / oat2	NP_659105	St	NLVLLALPR	9	-	-	504.8	781.5	682.5	569.4	456.3
		IS	NLVLLALPR	9	7	L	508.3	788.5	689.5	576.4	463.3
slc22a8 / oat3	NP_112471	St	YGLSDLFR ^b	8 ^b	-	-	485.8 ^b	807.4 ^b	750.4 ^b	637.3 ^b	550.3 ^c
		IS	YGLSDLFR ^b	8 ^b	6 ^b	L ^b	489.3 ^b	814.4 ^b	757.4 ^b	644.3 ^b	557.3 ^c
slc22a18	NP_001036225	St	TLGPTLGGLLYR	12	-	-	630.9	1046.6	892.5	791.5	678.4
		IS	TLGPTLGGLLYR	12	10	L	634.4	1053.6	899.5	798.5	685.4
slc29a1 / ent1	NP_075018	St	ALADPTVALPAR ^a	12 ^a	-	-	597.8 ^a	824.5 ^a	527.3 ^a	456.3 ^a	343.2 ^a
		IS	ALADPTVALPAR ^a	12 ^a	11 ^a	A ^a	599.8 ^a	828.5 ^a	531.3 ^a	460.3 ^a	347.2 ^a
slc47a1 / mate1	NP_080459	St	HVGVLQR ^b	8 ^b	-	-	461.3 ^b	784.5 ^b	685.4 ^b	529.3 ^b	416.3
		IS	HVGVLQR ^b	8 ^b	6 ^b	L ^b	464.8 ^b	791.5 ^b	692.4 ^b	536.3 ^b	423.3
slc47a2 / mate2	NP_001028714	St	VGNALGAGNADQAR ^b	14 ^b	-	-	657.3 ^b	972.5	859.4 ^b	802.4 ^b	731.3 ^b
		IS	VGNALGAGNADQAR ^b	14 ^b	13 ^b	A ^b	659.3 ^b	976.5	863.4 ^b	806.4 ^b	735.3 ^b

slc51b / ostβ	NP_849264	St	ENNSQVFLR	9	-	-	553.8	749.4	662.4	435.3	288.2
		IS	ENNSQVFLR	9	8	L	557.3	756.4	669.4	442.3	295.2
Others											
villin-1	NP_033535	St	YNDEPVQIR	9	-	-	567.3	970.5	856.5	741.4	612.4
		IS	YNDEPVQIR	9	9	R	572.3	980.5	866.5	751.4	622.4
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	NP_659149 (α1)	St	AAVPDAVGK ^d	9 ^d	-	-	414.2 ^d	685.4 ^d	586.3 ^d	489.3 ^d	374.2 ^d
(α1, α2, α3 subunits)	NP_848492 (α2)										
	NP_001277398 (α3)										
		IS	AAVPDAVGK ^d	9 ^d	7 ^d	V ^d	417.2 ^d	691.4 ^d	592.3 ^d	495.3 ^d	380.2 ^d
<Monkey>											
ABC transporter											
ABCA1	EHH57185	St	FVSPLSWDLVGR ^c	12 ^c	-	-	688.4 ^c	1129.6 ^c	1042.6 ^c	832.4 ^c	945.5 ^c
		IS	FVSPLSWDLVGR ^c	12 ^c	9 ^c	L ^c	691.9 ^c	1136.6 ^c	1049.6 ^c	839.4 ^c	952.5 ^c
P-gp / ABCB1 / MDR1	NP_001274251	St	NTTGALTTR ^c	9 ^c	-	-	467.8 ^c	618.4 ^c	719.4 ^c	490.3 ^c	561.3 ^c
		IS	NTTGALTTR ^c	9 ^c	6 ^c	L ^c	471.3 ^c	625.4 ^c	726.4 ^c	497.3 ^c	568.3 ^c
ABCC1 / MRP1	NP_001271100	St	TPSGNLVNR ^c	9 ^c	-	-	479.3 ^c	759.4 ^c	672.4 ^c	501.3 ^c	615.4 ^c
		IS	TPSGNLVNR ^c	9 ^c	6 ^c	L ^c	482.8 ^c	766.4 ^c	679.4 ^c	508.3 ^c	622.4 ^c
ABCC2 / MRP2	NP_001274645	St	QLLNNILR ^c	8 ^c	-	-	492.3 ^c	742.5 ^c	629.4 ^c	515.3 ^c	401.3 ^c

		IS	QLLNNILR ^c	8°	7°	L ^c	495.8°	749.5°	636.4°	522.3°	408.3°
ABCG2 / BCRP	XP_005555445	St	SSLLDVLAAR ^c	10°	-	-	522.8°	644.4°	757.5°	529.3°	430.3°
		IS	SSLLDVLAAR ^c	10°	7°	L ^c	526.3°	651.4°	764.5°	536.3°	437.3°
ABCG5	XP_005576053	St	DSPGVFSK	8	-	-	418.7	634.4	537.3	480.3	721.4
		IS	DSPGVFSK	8	6	F	423.7	644.4	547.3	490.3	731.4
SLC transporter											
SLC2A5 / GLUT5	XP_005544916	St	AAGFISVLK	9	-	-	453.3	763.4	559.4	834.5	706.4
		IS	AAGFISVLK	9	9	K	457.3	771.4	567.4	842.5	714.4
SLC5A1 / SGLT1	XP_005567565	St	ADSFHIFR	8	-	-	331.5	403.7	286.7	435.3	461.2
		IS	ADSFHIFR	8	8	R	334.8	408.7	291.7	445.3	466.2
SLC15A1 / PEPT1	AAQ56235	St	TLPVF PK	7	-	-	401.2	587.4	244.2	215.1	391.2
		IS	TLPVF PK	7	6	P	404.2	593.4	250.2	215.1	397.2
SLC21A8 / OATP1B3	NP_001270120	St	IYNSVFFGR ^c	9°	-	-	551.8°	526.3°	826.4°	712.4°	989.5°
		IS	IYNSVFFGR ^c	9°	7°	F ^c	556.8°	536.3°	836.4°	722.4°	999.5°
SLC21A11 / OATP3A1	XP_005560603	St	SGELQGDEAQR ^c	11°	-	-	595.3°	675.3°	803.4°	503.3°	916.4
		IS	SGELQGDEAQR ^c	11°	9°	A ^c	597.3°	679.3°	807.4°	507.3°	920.5°
SLC22A5 / OCTN2	XP_005557779	St	TWNIR	5	-	-	345.2	402.2	260.1	288.2	588.3
		IS	TWNIR	5	4	I	348.7	409.2	260.1	295.2	595.3

SLC51A / OST α	XP_005545328	St	YTADLLEVLK	10	-	-	582.8	900.5	601.4	829.5	1001.6
		IS	YTADLLEVLK	10	9	L	586.3	907.5	608.4	836.5	1008.6
SLC51B / OST β	XP_005559866	St	ENPEVLHLDEAR	12	-	-	474.6	589.8	246.2	603.3	740.4
		IS	ENPEVLHLDEAR	12	12	R	477.9	594.8	256.2	613.3	750.4
CYP											
CYP1A1	NP_001306411	St	VEFSVPPGVK	10	-	-	529.8	497.3	830.5	400.3	683.4
		IS	VEFSVPPGVK	10	10	K	533.8	505.3	838.5	408.3	691.4
CYP1A2	NP_001306412	St	YLPNPALQR	9	-	-	536.3	398.2	249.2	584.4	698.4
		IS	YLPNPALQR	9	7	L	539.8	401.7	249.2	591.4	705.4
CYP2B6	NP_001274566	St	IPPTYQIR	8	-	-	494.3	777.4	680.4	579.3	416.3
		IS	IPPTYQIR	8	8	R	499.3	787.4	690.4	589.3	426.3
CYP2E1	NP_001306424	St	GIIFNNGPTWK	11	-	-	623.8	963.5	284.2	816.4	538.8
		IS	GIIFNNGPTWK	11	8	P	626.8	969.5	284.2	822.4	541.8
CYP3A8	NP_001271463	St	YWPEPEK	7	-	-	474.7	599.3	350.1	373.2	276.2
		IS	YWPEPEK	7	7	K	478.7	607.3	350.1	381.2	284.2
UGT											
UGT1A1	NP_001270367	St	TYPVPFQR	8	-	-	504.3	547.3	743.4	450.2	646.4
		IS	TYPVPFQR	8	6	F	509.3	557.3	753.4	460.2	656.4

UGT1A6	AAF15547	St	DIVEVLSDR	9	-	-	523.3	490.3	589.3	718.4	817.4
		IS	DIVEVLSDR	9	6	L	526.8	497.3	596.3	725.4	824.4
UGT1A9	AAF15546	St	YLSLPSVVFAR	11	-	-	626.4	775.4	277.2	364.2	975.6
		IS	YLSLPSVVFAR	11	11	R	631.4	785.4	277.2	364.2	985.6
Others											
villin-1	XP_005574339	St	DPETPIIVVK	10	-	-	555.8	668.5	769.5	246.2	345.3
		IS	DPETPIIVVK	10	10	K	559.8	676.5	777.5	254.2	353.3
γ -GTP	XP_005567828	St	QGFPVGK	7	-	-	366.7	400.3	303.3	547.4	604.3
		IS	QGFPVGK	7	7	K	370.7	408.3	311.3	555.4	612.3
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	XP_005542265 (α 1)	St	AAVPDAVGK ^e	9 ^e	-	-	414.2 ^e	685.4 ^e	586.3 ^e	489.3 ^e	374.2 ^e
(α 1, α 2, α 3 subunits)	XP_005541327 (α 2)										
	XP_015297549 (α 3)										
		IS	AAVPDAVGK ^e	9 ^e	7 ^e	V ^e	417.2 ^e	691.4 ^e	592.3 ^e	495.3 ^e	380.2 ^e
P450R	XP_005549394	St	IQTLTSSVR	9	-	-	502.8	763.4	549.3	448.3	343.2
		IS	IQTLTSSVR	9	8	V	505.8	769.4	555.3	454.3	343.2
<Human>											
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	NP_000692 (α 1)	St	AAVPDAVGK ^a	9 ^a	-	-	414.2 ^a	685.4 ^a	586.3 ^a	489.3 ^a	374.2 ^a
(α 1, α 2, α 3 subunits)	NP_000693 (α 2)										

NP_689509 ($\alpha 3$)

IS	AAVPDAVGK ^a	9 ^a	7 ^a	V ^a	417.2 ^a	691.4 ^a	592.3 ^a	495.3 ^a	380.2 ^a
----	------------------------	----------------	----------------	----------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------

The SRM/MRM transitions in a triple quadrupole mass spectrometer were determined from MS/MS spectra obtained by direct infusion of 1 μ M peptide solution at a flow rate of 5 μ L/min with a syringe pump (Harvard) into the mass spectrometer. Typically, doubly charged precursor ions were selected (Q1). Four transitions per peptide (Q3-1, -2, -3, and -4), corresponding to high-intensity fragment ions, were selected. The declustering potentials and collision energies were optimized to maximize signal strength. For the internal standard peptides, precursor ions and transitions corresponding to those of the standard peptides were selected, with the same declustering potentials and collision energies as for the standard peptides. ¹³C and ¹⁵N were used for amino acid labeling in the internal standard peptides. The concentration of each peptide in authentic solution was determined by means of HPLC-UV with quantitative amino acid analysis. The quantitative conditions marked a, b, c, d, and e were taken from Uchida et al. (2011b), Kamiie et al. (2008), Akanuma et al. (2011), Uchida et al. (2013), and Ito et al. (2011), respectively. The other quantitative conditions were determined in the present study. The amino acid sequence of probe peptide is specific for the target molecule, but is often common among its isoforms. The Genbank Accession Number of only one isoform is described in this table. AA, amino acid; St, standard; IS, internal standard.

Table 6-2. Peptide Probes and SRM/MRM Transitions for Quantification of Mouse, Monkey, and Human Molecules by Using Triple TOF 5600

Molecule	Genbank accession number	St or IS	Probe sequence	Number of AA	Position of	Stable isotope- labeled AA from the N terminal	SRM/MRM transition (m/z)				
					stable isotope- labeled AA		Q1 (m/z)	TOF range (m/z ± 0.025)			
								1	2	3	4
<Mouse>											
ABC transporter											
abcb4 / mdr2	NP_032856	St	IATEAIENIR	10	-	-	565.3	531.289	715.410	644.373	844.452
		IS	IATEAIENIR	10	5	A	567.3	531.289	719.417	644.373	848.460
abcc4 / mrp4	NP_001028508	St	APVLFFDR	8	-	-	482.8	584.283	697.367	796.435	893.488
		IS	APVLFFDR	8	4	L	486.3	584.283	704.384	803.452	900.505
SLC transporter											
slc2a1 / glut1	NP_035530	St	TFDEIASGFR	10	-	-	571.8	537.278	894.432	779.405	650.362
		IS	TFDEIASGFR	10	6	A	573.8	541.285	898.439	783.412	654.369

Others											
γ -gtp	NP_032142	St	LFQPSIQLAR	10	-	-	586.8	784.468	487.299	912.526	687.415
		IS	LFQPSIQLAR	10	8	L	590.4	791.485	494.316	919.544	694.432
<Monkey>											
ABC transporter											
ABCC3 / MRP3	XP_005583747	St	AEGEISDPFR	10	-	-	560.8	621.299	734.383	920.447	534.267
		IS	AEGEISDPFR	10	9	F	565.8	631.326	744.410	930.475	544.294
ABCC4 / MRP4	EHH58663	St	APVLFFDR	8	-	-	482.8	584.283	697.367	796.435	893.488
		IS	APVLFFDR	8	4	L	486.3	584.283	704.384	803.452	900.505
ABCC5 / MRP5	XP_005546569	St	SLSEASVAVDR	11	-	-	567.3	646.352	717.389	933.464	559.320
		IS	SLSEASVAVDR	11	2	L	570.8	646.352	717.389	933.464	559.320
ABCC6 / MRP6	EHH60190	St	TPIGNLLNR	9	-	-	499.3	686.395	799.479	402.246	629.373
		IS	TPIGNLLNR	9	9	R	504.3	696.403	809.487	412.254	639.381
ABCG8	XP_005576057	St	ASLLDVITSR	10	-	-	537.8	690.378	803.462	476.283	262.151
		IS	ASLLDVITSR	10	10	R	542.8	700.386	813.471	486.291	272.159
SLC transporter											
SLC2A1 / GLUT1	XP_005543756	St	TFDEIASGFR	10	-	-	571.8	537.278	894.432	779.405	650.362
		IS	TFDEIASGFR	10	6	A	573.8	541.285	898.439	783.412	654.369

SLC2A2 / GLUT2	XP_005546436	St	FLGATETV	8	-	-	837.4	318.182	261.160	619.309	720.357
		IS	FLGATETV	8	4	A	841.4	318.182	261.160	623.316	724.364
SLC3A2 / 4F2hc	NP_001272171	St	ADPVLSTQPGR	11	-	-	570.8	758.416	645.332	329.193	383.193
		IS	ADPVLSTQPGR	11	11	R	575.8	768.424	655.340	339.202	383.193
SLC6A6 / TAUT	XP_005571742	St	FYLYPDITR	9	-	-	594.3	601.331	877.478	764.394	504.278
		IS	FYLYPDITR	9	7	I	597.8	608.348	884.495	771.411	511.295
SLC10A2 / ASBT	EHH58696	St	ENATEPESSFYK	12	-	-	701.3	857.404	310.176	631.309	986.447
		IS	ENATEPESSFYK	12	12	K	705.3	865.418	318.190	639.323	994.461
SLC16A1 / MCT1	NP_001270087	St	SITVFFK	7	-	-	421.2	641.366	294.181	441.250	540.318
		IS	SITVFFK	7	6	F	426.3	651.393	304.209	451.277	550.345
SLC21A2 / PGT	NP_001270644	St	VNTAAVNLVPGDPR	14	-	-	711.9	541.273	640.341	867.468	966.537
		IS	VNTAAVNLVPGDPR	14	13	P	714.9	547.287	646.355	873.482	972.551
SLC21A3 / OATP1A2	XP_005570368	St	EGLENNADIIK	11	-	-	608.3	787.431	916.474	673.388	559.345
		IS	EGLENNADIIK	11	11	K	612.3	795.445	924.488	681.402	567.359
SLC21A6 / OATP1B1	NP_001271469	St	YVEQEYGPSSK	12	-	-	707.8	418.230	603.310	766.373	1152.517
		IS	YVEQEYGPSSK	12	12	K	711.8	426.244	611.324	774.387	1160.531
SLC21A9 / OATP2B1	NP_001306524	St	VLLQTLR	7	-	-	421.8	630.394	517.309	389.251	743.478
		IS	VLLQTLR	7	6	L	425.3	637.411	524.327	396.268	750.495

SLC21A12 / OATP4A1	XP_015285542	St	YEVEADTGVR	10	-	-	569.8	846.432	747.363	432.257	618.321
		IS	YEVEADTGVR	10	10	R	574.8	856.440	757.372	442.265	628.329
SLC21A14 / OATP1C1	Q9GMU6	St	LYDSNVFR	8	-	-	507.3	737.358	622.331	900.421	535.299
		IS	LYDSNVFR	8	7	F	512.3	747.385	632.358	910.448	545.326
SLC22A1 / OCT1	XP_005551559	St	LSPSFADLFR	10	-	-	576.8	476.748	768.404	855.436	621.336
		IS	LSPSFADLFR	10	8	L	580.3	480.257	775.421	862.453	628.353
SLC22A2 / OCT2	AKU48158	St	SLPASLQR	8	-	-	436.3	336.196	671.384	503.294	574.331
		IS	SLPASLQR	8	6	F	439.8	339.704	678.401	510.311	581.348
SLC22A3 / OCT3	XP_005551557	St	FLQGVFGK	8	-	-	448.3	635.351	507.293	351.203	748.435
		IS	FLQGVFGK	8	6	F	453.3	645.379	517.320	361.230	758.463
SLC22A4 / OCTN1	XP_005557778	St	AFILDLFR	8	-	-	497.8	663.383	550.298	776.467	435.272
		IS	AFILDLFR	8	6	L	501.3	670.400	557.316	783.484	442.289
SLC22A6 / OAT1	NP_001274626	St	TSLAVLGK	8	-	-	394.7	600.408	487.324	317.219	416.287
		IS	TSLAVLGK	8	6	L	398.3	607.425	494.341	324.236	423.304
SLC22A7 / OAT2	XP_005552973	St	NVALLALPR	9	-	-	483.8	753.498	569.377	456.293	682.461
		IS	NVALLALPR	9	7	L	487.3	760.516	576.394	463.310	689.478
SLC22A8 / OAT3	NP_001306519	St	YTAADLFR	8	-	-	478.7	692.373	435.272	621.336	793.420
		IS	YTAADLFR	8	8	R	483.7	702.381	445.280	631.344	803.429

SLC28A1 / CNT1	EHH63302	St	LVYPEVEESK	10	-	-	596.8	817.394	980.457	591.299	720.341
		IS	LVYPEVEESK	10	10	K	600.8	825.408	988.471	599.313	728.355
SLC28A2 / CNT2	EHH63051	St	LAYPEVEESK	10	-	-	582.8	817.394	980.457	720.341	591.299
		IS	LAYPEVEESK	10	6	V	585.8	823.408	986.471	726.355	597.312
SLC29A1 / ENT1	XP_005552919	St	WLPSVLAR	9	-	-	527.8	755.478	658.425	571.393	458.309
		IS	WLPSVLAR	9	7	L	531.3	762.495	665.442	578.410	465.326
SLC46A1 / PCFT	EHH57819	St	SIVQLYVAPAPEK	13	-	-	707.9	541.298	874.467	612.335	711.404
		IS	SIVQLYVAPAPEK	13	11	P	710.9	547.312	880.481	618.349	717.418
<Human>											
ABC transporter											
P-gp / ABCB1 / MDR1	NP_001335874	St	FYDPLAGK ^{a,c}	8 ^{a,c}	-	-	455.7 ^{a,c}	763.399 ^c	600.335 ^{a,c}	485.308 ^{a,c}	275.172
		IS	FYDPLAGK ^{a,c}	8 ^{a,c}	6 ^{a,c}	A ^{a,c}	457.7 ^{a,c}	767.406 ^c	604.342 ^{a,c}	489.316 ^c	279.179 ^a
ABCB4 / MDR3	NP_000434	St	IATEAIENIR ^a	10 ^a	-	-	565.3 ^a	531.289 ^a	715.410 ^a	644.373 ^a	844.452 ^a
		IS	IATEAIENIR ^a	10 ^a	5 ^a	A ^a	567.3 ^a	531.289 ^a	719.417 ^a	644.373 ^a	848.460 ^a
ABCC1 / MRP1	NP_004987	St	DFVSALPDK ^b	9 ^b	-	-	496.3 ^b	630.346 ^b	359.193	729.414 ^b	543.314
		IS	DFVSALPDK ^b	9 ^b	7 ^b	P ^b	499.3 ^b	636.360 ^b	365.206	735.428 ^b	549.328
ABCC2 / MRP2	NP_000383	St	QLLNNILR ^a	8 ^a	-	-	492.3 ^a	742.457 ^a	629.373 ^a	515.330 ^a	401.287 ^a
		IS	QLLNNILR ^a	8 ^a	7 ^a	L ^a	495.8 ^a	749.474 ^a	636.390 ^a	522.347 ^a	408.304 ^a

ABCC3 / MRP3	NP_003777	St	AEGEISDPFR ^a	10 ^a	-	-	560.8 ^a	621.299 ^a	734.383 ^a	920.447 ^a	534.267 ^a
		IS	AEGEISDPFR ^a	10 ^a	9 ^a	F ^a	565.8 ^a	631.326 ^a	744.410 ^a	930.475	544.294 ^a
ABCC4 / MRP4	NP_005836	St	APVLFFDR ^{a,b}	8 ^{a,b}	-	-	482.8 ^{a,b}	584.283 ^{a,b}	697.367 ^{a,b}	796.435 ^{a,b}	893.488 ^a
		IS	APVLFFDR ^{a,b}	8 ^{a,b}	4 ^{a,b}	L ^{a,b}	486.3 ^{a,b}	584.283 ^{a,b}	704.384 ^{a,b}	803.452 ^{a,b}	900.505 ^a
ABCC5 / MRP5	NP_005679	St	SLSEASVAVDR ^{a,b}	11 ^{a,b}	-	-	567.3 ^{a,b}	646.352 ^{a,b}	717.389 ^{a,b}	933.464 ^{a,b}	559.320 ^a
		IS	SLSEASVAVDR ^{a,b}	11 ^{a,b}	2 ^{a,b}	L ^{a,b}	570.8 ^{a,b}	646.352 ^{a,b}	717.389 ^{a,b}	933.464 ^{a,b}	559.320 ^a
ABCC6 / MRP6	NP_001162	St	APETEPFLR ^a	9 ^a	-	-	530.3 ^a	532.324 ^a	762.415 ^a	891.457 ^a	661.367 ^a
		IS	APETEPFLR ^a	9 ^a	8 ^a	L ^a	533.8 ^a	539.342	769.432 ^a	898.474 ^a	668.384 ^a
ABCG2 / BCRP	NP_004818	St	SSLLDVLAAR ^{a,b}	10 ^{a,b}	-	-	522.8 ^{a,b}	644.373 ^{a,b}	757.457 ^{a,b}	529.346 ^{a,b}	430.277 ^{a,b}
		IS	SSLLDVLAAR ^{a,b}	10 ^{a,b}	7 ^{a,b}	L ^{a,b}	526.3 ^{a,b}	651.390 ^{a,b}	764.474 ^{a,b}	536.363 ^{a,b}	437.295 ^b
ABCG8	NP_071882	St	ASLLDVITGR ^{a,b}	10 ^{a,b}	-	-	522.8 ^{a,b}	660.368 ^{a,b}	545.341 ^{a,b}	446.272 ^{a,b}	773.452 ^{a,b}
		IS	ASLLDVITGR ^{a,b}	10 ^{a,b}	4 ^{a,b}	L ^{a,b}	526.3 ^{a,b}	660.368 ^{a,b}	545.341 ^{a,b}	446.272 ^{a,b}	780.469 ^{a,b}
SLC transporter											
SLC2A1 / GLUT1	NP_006507	St	TFDEIASGFR ^a	10 ^a	-	-	571.8 ^a	537.278 ^a	894.432 ^a	779.405 ^a	650.362 ^a
		IS	TFDEIASGFR ^a	10 ^a	6 ^a	A ^a	573.8 ^a	541.285 ^a	898.439 ^a	783.412 ^a	654.369 ^a
SLC2A2 / GLUT2	NP_000331	St	FLGATETV ^{a,b}	8 ^{a,b}	-	-	837.4 ^{a,b}	318.182 ^b	261.160 ^{a,b}	619.309 ^a	720.357
		IS	FLGATETV ^{a,b}	8 ^{a,b}	4 ^{a,b}	A ^{a,b}	841.4 ^{a,b}	318.182 ^b	261.160 ^{a,b}	623.316 ^a	724.364
SLC2A5 / GLUT5	NP_003030	St	AAGFISVLK ^{a,b}	9 ^{a,b}	-	-	453.3 ^{a,b}	763.471 ^{a,b}	559.382 ^b	834.509 ^b	706.450 ^a

		IS	AAGFISVLK ^{a,b}	9 ^{a,b}	9 ^{a,b}	K ^{a,b}	457.3 ^{a,b}	771.486 ^{a,b}	567.396 ^{a,b}	842.523 ^{a,b}	714.464 ^a
SLC3A2 / 4F2hc	NP_001012680	St	ADLLLSTQPGR ^{a,b}	11 ^{a,b}	-	-	585.8 ^{a,b}	645.332 ^{a,b}	871.500 ^a	758.416 ^{a,b}	558.300 ^a
		IS	ADLLLSTQPGR ^{a,b}	11 ^{a,b}	9 ^{a,b}	P ^{a,b}	588.8 ^{a,b}	651.345 ^{a,b}	877.514	764.430 ^{a,b}	564.313 ^a
SLC5A1 / SGLT1	NP_000334	St	IDLDAEEENIQEGPK ^b	15 ^b	-	-	850.4 ^b	301.187 ^b	558.288	1043.501 ^b	914.458
		IS	IDLDAEEENIQEGPK ^b	15 ^b	15 ^b	K ^b	854.4 ^b	309.201 ^b	566.303	1051.515 ^b	922.472
SLC6A6 / TAUT	NP_003034	St	FYLYPDITR ^{a,b}	9 ^{a,b}	-	-	594.3 ^{a,b}	601.331 ^b	877.478 ^{a,b}	764.394 ^{a,b}	504.278 ^a
		IS	FYLYPDITR ^{a,b}	9 ^{a,b}	7 ^{a,b}	I ^{a,b}	597.8 ^{a,b}	608.348 ^{a,b}	884.495 ^{a,b}	771.411 ^{a,b}	511.295 ^a
SLC10A2 / ASBT	NP_000443	St	IAGLPWYR ^{a,b}	8 ^{a,b}	-	-	488.3 ^{a,b}	621.314 ^{a,b}	242.150 ^{a,b}	791.420 ^{a,b}	862.457 ^{a,b}
		IS	IAGLPWYR ^{a,b}	8 ^{a,b}	5 ^{a,b}	P ^{a,b}	491.3 ^{a,b}	627.328 ^{a,b}	242.150 ^{a,b}	797.434 ^{a,b}	868.471 ^{a,b}
SLC15A1 / PEPT1	NP_005064	St	TLPVFPK ^{a,b}	7 ^{a,b}	-	-	401.2 ^{a,b}	587.355 ^{a,b}	244.166 ^a	215.139 ^a	391.234 ^{a,b}
		IS	TLPVFPK ^{a,b}	7 ^{a,b}	6 ^{a,b}	P ^{a,b}	404.3 ^a	593.369 ^{a,b}	250.180	215.139 ^a	397.248 ^{a,b}
SLC15A2 / PEPT2	NP_066568	St	WTLQAIR ^{a,b}	7 ^{a,b}	-	-	444.3 ^{a,b}	701.431 ^b	600.383 ^{a,b}	487.299 ^{a,b}	359.240 ^a
		IS	WTLQAIR ^{a,b}	7 ^{a,b}	6 ^{a,b}	I ^{a,b}	447.8 ^{a,b}	708.448 ^{a,b}	607.400 ^{a,b}	494.316 ^{a,b}	366.257 ^a
SLC16A1 / MCT1	NP_003042	St	SITVFFK ^{a,b}	7 ^{a,b}	-	-	421.2 ^{a,b}	641.366 ^{a,b}	294.181 ^a	441.250 ^{a,b}	540.318 ^a
		IS	SITVFFK ^{a,b}	7 ^{a,b}	6 ^{a,b}	F ^{a,b}	426.3 ^a	651.393 ^{a,b}	304.209	451.277 ^{a,b}	550.345 ^a
SLC21A2 / PGT	NP_005621	St	VNTAAVNLPVGDPR ^a	14 ^a	-	-	711.9 ^a	541.273 ^a	640.341 ^a	867.468 ^a	966.537 ^a
		IS	VNTAAVNLPVGDPR ^a	14 ^a	13 ^a	P ^a	714.9 ^a	547.287 ^a	646.355 ^a	873.482 ^a	972.551 ^a
SLC21A3 / OATP1A2	NP_066580	St	EGLETNADIHK ^a	11 ^a	-	-	601.8 ^a	774.436 ^a	673.388 ^a	559.345 ^a	903.478 ^a

		IS	EGLETNADIHK ^a	11 ^a	10 ^a	I ^a	605.3 ^a	781.453 ^a	680.405 ^a	566.362 ^a	910.496
SLC21A8 / OATP1B3	NP_062818	St	IYNSVFFGR ^a	9 ^a	-	-	551.8 ^a	526.277 ^a	826.421 ^a	712.378 ^a	989.484 ^a
		IS	IYNSVFFGR ^a	9 ^a	7 ^a	F ^a	556.8 ^a	536.305 ^a	836.448 ^a	722.405 ^a	999.511 ^a
SLC21A14 / OATP1C1	NP_001139418	St	LYDSNVFR ^{a,b}	8 ^{a,b}	-	-	507.3 ^{a,b}	737.358 ^{a,b}	622.331 ^{a,b}	900.421 ^{a,b}	535.299 ^a
		IS	LYDSNVFR ^{a,b}	8 ^{a,b}	7 ^{a,b}	F ^{a,b}	512.3 ^{a,b}	747.385 ^{a,b}	632.358 ^{a,b}	910.448 ^{a,b}	545.326 ^a
SLC21A20 / OATP4C1	NP_851322	St	HLPGTAEIQAGK	12	-	-	611.3	971.516	516.314	874.463	817.442
		IS	HLPGTAEIQAGK	12	10	A	613.3	975.523	520.321	878.470	821.449
SLC22A1 / OCT1	NP_003048	St	LSPSFADLFR ^{a,b}	10 ^{a,b}	-	-	576.8 ^{a,b}	476.748 ^{a,b}	768.404 ^{a,b}	855.436 ^{a,b}	621.336 ^a
		IS	LSPSFADLFR ^{a,b}	10 ^{a,b}	8 ^{a,b}	L ^{a,b}	580.3 ^{a,b}	480.257 ^{a,b}	775.421 ^{a,b}	862.453 ^{a,b}	628.353 ^a
SLC22A2 / OCT2	NP_003049	St	SLPASLQR ^{a,b}	8 ^{a,b}	-	-	436.3 ^a	336.196	671.384 ^a	503.294 ^{a,b}	574.331 ^{a,b}
		IS	SLPASLQR ^{a,b}	8 ^{a,b}	6 ^{a,b}	L ^{a,b}	439.8 ^a	339.704 ^a	678.401 ^a	510.311 ^{a,b}	581.348 ^{a,b}
SLC22A3 / OCT3	NP_068812	St	FLQGVFGK ^{a,b}	8 ^{a,b}	-	-	448.3 ^a	635.351 ^a	507.293 ^{a,b}	351.203 ^{a,b}	748.435 ^a
		IS	FLQGVFGK ^{a,b}	8 ^{a,b}	6 ^{a,b}	F ^{a,b}	453.3 ^a	645.379	517.320 ^{a,b}	361.230 ^{a,b}	758.463
SLC22A6 / OAT1	NP_004781	St	TSLAVLGK ^a	8 ^a	-	-	394.7 ^a	600.408 ^a	487.324 ^a	317.219	416.287 ^a
		IS	TSLAVLGK ^a	8 ^a	6 ^a	L ^a	398.3 ^a	607.425 ^a	494.341 ^a	324.236 ^a	423.304 ^a
SLC22A7 / OAT2	NP_006663	St	NVALLALPR ^{a,b}	9 ^{a,b}	-	-	483.8 ^{a,b}	753.498 ^{a,b}	569.377 ^{a,b}	456.293 ^{a,b}	682.461 ^{a,b}
		IS	NVALLALPR ^{a,b}	9 ^{a,b}	7 ^{a,b}	L ^{a,b}	487.3 ^{a,b}	760.516 ^b	576.394 ^{a,b}	463.310 ^{a,b}	689.478 ^{a,b}
SLC22A8 / OAT3	NP_004245	St	YTASDLFR ^{a,b}	8 ^{a,b}	-	-	486.7 ^{a,b}	708.368 ^{a,b}	435.272	637.330 ^{a,b}	809.415 ^{a,b}

		IS	YTASDLFR ^{a,b}	8 ^{a,b}	6 ^{a,b}	L ^{a,b}	490.3 ^a	715.385 ^{a,b}	442.289 ^a	644.348 ^{a,b}	816.432 ^{a,b}
SLC22A13 / OAT10	NP_004247	St	TGPSGNALDLFR ^{a,b}	12 ^{a,b}	-	-	624.3 ^{a,b}	734.420 ^a	992.516 ^{a,b}	905.484 ^{a,b}	848.463 ^a
		IS	TGPSGNALDLFR ^{a,b}	12 ^{a,b}	10 ^{a,b}	L ^{a,b}	627.8 ^{a,b}	741.437 ^a	999.533 ^{a,b}	912.501 ^{a,b}	855.480 ^a
SLC22A18	NP_001302430	St	TLGPTVGGLLYR ^{a,b}	12 ^{a,b}	-	-	623.9 ^{a,b}	678.394	1032.584 ^{a,b}	777.462 ^a	878.510 ^b
		IS	TLGPTVGGLLYR ^{a,b}	12 ^{a,b}	10 ^{a,b}	L ^{a,b}	627.4 ^{a,b}	685.411 ^a	1039.601 ^{a,b}	784.479 ^a	885.527 ^{a,b}
SLC28A1 / CNT1	NP_004204	St	AGSSSFVGEALVK ^a	13 ^a	-	-	656.4 ^a	763.435 ^a	616.367 ^a	862.503 ^a	559.345 ^a
		IS	AGSSSFVGEALVK ^a	13 ^a	11 ^a	L ^a	659.9 ^a	770.452 ^a	623.384 ^a	869.521	566.362 ^a
SLC28A2 / CNT2	NP_004203	St	LAYPEVEESK ^{a,b}	10 ^{a,b}	-	-	582.8 ^{a,b}	817.394 ^{a,b}	980.457 ^{a,b}	720.341 ^a	591.299
		IS	LAYPEVEESK ^{a,b}	10 ^{a,b}	6 ^{a,b}	V ^{a,b}	585.8 ^{a,b}	823.408 ^{a,b}	986.471 ^{a,b}	726.355 ^a	597.312 ^a
SLC29A1 / ENT1	NP_001071643	St	WLPSLVLAR ^a	9 ^a	-	-	527.8 ^a	755.478	658.425 ^a	571.393 ^a	458.309 ^a
		IS	WLPSLVLAR ^a	9 ^a	7 ^a	L ^a	531.3 ^a	762.495 ^a	665.442 ^a	578.410 ^a	465.326 ^a
SLC46A1 / PCFT	NP_542400	St	SIVQLYVAPAPEK ^{a,b}	13 ^{a,b}	-	-	707.9 ^{a,b}	541.298 ^{a,b}	874.467 ^{a,b}	612.335 ^{a,b}	711.404 ^a
		IS	SIVQLYVAPAPEK ^{a,b}	13 ^{a,b}	11 ^{a,b}	P ^{a,b}	710.9 ^{a,b}	547.312 ^{a,b}	880.481 ^{a,b}	618.349 ^{a,b}	717.418
SLC47A1 / MATE1	NP_060712	St	GGPEATLEVR ^a	10 ^a	-	-	514.8 ^a	457.751 ^a	617.362 ^a	688.399 ^a	817.442
		IS	GGPEATLEVR ^a	10 ^a	9 ^a	V ^a	517.8 ^a	460.758 ^a	623.376 ^a	694.413 ^a	823.455 ^a
SLC47A2 / MATE2	NP_690872	St	YLQNQGWLK	9	-	-	575.3	873.458	745.399	631.356	986.542
		IS	YLQNQGWLK	9	8	L	578.8	880.475	752.417	638.374	993.559
SLC51A / OST α	NP_689885	St	YTADLLEVLK ^b	10 ^b	-	-	582.8 ^b	900.540 ^b	601.392	829.503	1001.588 ^b

		IS	YTADLLEVLK ^b	10 ^b	9 ^b	L ^b	586.3 ^b	907.557 ^b	608.409	836.520	1008.605 ^b
CYP											
CYP1A1	NP_000490	St	FLTPDGAIDK ^b	10 ^b	-	-	538.8 ^b	816.410 ^b	715.362 ^b	618.309	503.283
		IS	FLTPDGAIDK ^b	10 ^b	10 ^b	K ^b	542.8 ^b	824.424 ^b	723.376 ^b	626.324	511.297
CYP1A2	NP_000752	St	YLPNPALQR ^b	9 ^b	-	-	536.3 ^b	398.227 ^b	249.160	584.352 ^b	698.395
		IS	YLPNPALQR ^b	9 ^b	7 ^b	L ^b	539.8 ^b	401.736 ^b	249.160	591.369 ^b	705.412
CYP1B1	NP_000095	St	ELVALLVR ^b	8 ^b	-	-	456.8 ^b	670.461 ^b	571.393 ^b	500.356 ^b	387.272 ^b
		IS	ELVALLVR ^b	8 ^b	7 ^b	V ^b	459.8 ^b	676.475 ^b	577.407 ^b	506.369 ^b	393.285 ^b
CYP2A6	NP_000753	St	GTGGANIDPTFFLSR	15	-	-	776.9	867.472	982.499	1209.626	1095.583
		IS	GTGGANIDPTFFLSR	15	13	L	780.4	874.490	989.517	1216.644	1102.601
CYP2B6	NP_000758	St	GYGVIFANGNR	11	-	-	584.3	947.506	791.416	678.332	531.263
		IS	GYGVIFANGNR	11	7	A	586.3	951.513	795.423	682.339	535.271
CYP2C9	NP_000762	St	GIFPLAER ^b	8 ^b	-	-	451.8 ^b	585.336 ^b	366.706 ^b	488.283	375.199
		IS	GIFPLAER ^b	8 ^b	5 ^b	L ^b	455.3 ^b	592.353 ^b	370.214 ^b	495.300	375.199
CYP2C18	NP_000763	St	IAENFAYIK ^b	9 ^b	-	-	534.8 ^b	955.488 ^b	884.451 ^b	494.297	423.260
		IS	IAENFAYIK ^b	9 ^b	8 ^b	I ^b	538.3 ^b	962.506 ^b	891.469 ^b	501.315	430.278
CYP2D6	NP_000097	St	DIEVQGFR ^b	8 ^b	-	-	482.2 ^b	735.379 ^b	229.119 ^b	379.209	507.268
		IS	DIEVQGFR ^b	8 ^b	7 ^b	F ^b	487.3	745.406 ^b	229.119 ^b	389.236	517.295

CYP2E1	NP_000764	St	GIIFNNGPTWK ^b	11 ^b	-	-	623.8 ^b	963.468 ^b	284.197	816.400 ^b	538.780
		IS	GIIFNNGPTWK ^b	11 ^b	8 ^b	P ^b	626.8 ^b	969.482 ^b	284.197	822.414 ^b	541.787
CYP2J2	NP_000766	St	DFIDAYLK	8	-	-	492.8	376.187	722.408	609.324	423.260
		IS	DFIDAYLK	8	8	K	496.8	376.187	730.423	617.339	431.275
CYP3A4	NP_059488	St	LSLGGLLQPEK	11	-	-	577.8	841.478	373.208	954.562	784.457
		IS	LSLGGLLQPEK	11	11	K	581.9	849.492	381.223	962.576	792.471
CYP3A7	NP_000756	St	EIDTVLPNK	9	-	-	514.8	358.209	471.293	570.361	786.436
		IS	EIDTVLPNK	9	9	K	518.8	366.223	479.307	578.375	794.450
CYP3A43	NP_073731	St	YIPFGAGPR ^c	9 ^c	-	-	489.3 ^c	351.190 ^c	249.160 ^c	457.252	604.320
		IS	YIPFGAGPR ^c	9 ^c	8 ^c	P ^c	492.3 ^c	354.197 ^c	249.160 ^c	463.266	610.334
CYP4A11	NP_000769	St	IPIPIAR ^b	7 ^b	-	-	390.3 ^b	333.719	211.144	666.430 ^b	569.377 ^b
		IS	IPIPIAR ^b	7 ^b	6 ^b	A ^b	392.3 ^b	335.722	211.144	670.437 ^b	573.384 ^b
CYP51A1	NP_000777	St	FAYVPFGAGR ^b	10 ^b	-	-	542.8 ^b	604.320 ^b	866.452 ^b	382.176 ^b	481.245
		IS	FAYVPFGAGR ^b	10 ^b	8 ^b	A ^b	544.8 ^b	608.327 ^b	870.459 ^b	382.176 ^b	481.245
UGT											
UGT1A1	NP_000454	St	TYPVPFQR ^b	8 ^b	-	-	504.3 ^b	547.299 ^b	743.420 ^b	450.246	646.367
		IS	TYPVPFQR ^b	8 ^b	6 ^b	F ^b	509.3 ^b	557.326 ^b	753.447 ^b	460.273	656.394
UGT1A4	NP_009051	St	GLQVPLPR	8	-	-	440.3	385.256	482.309	581.377	709.436

		IS	GLQVPLPR	8	7	P	443.3	391.270	488.323	587.391	715.450
UGT1A6	NP_001063	St	DIVEVLSDR ^b	9 ^b	-	-	523.3 ^b	490.262	589.330 ^b	718.373 ^b	817.441 ^b
		IS	DIVEVLSDR ^b	9 ^b	6 ^b	L ^b	526.8 ^b	497.279	596.348 ^b	725.390 ^b	824.459 ^b
UGT2B4	NP_066962	St	FSPGYAIEK ^b	9 ^b	-	-	506.3 ^b	389.240 ^b	777.414 ^b	680.362	623.340
		IS	FSPGYAIEK ^b	9 ^b	9 ^b	K ^b	510.3 ^b	397.254 ^b	785.429 ^b	688.376	631.354
UGT2B7	NP_001065	St	TILDELIQR ^c	9 ^c	-	-	550.8 ^c	886.499 ^c	773.415 ^c	658.388	529.346
		IS	TILDELIQR ^c	9 ^c	7 ^c	I ^c	554.3 ^c	893.517 ^c	780.433 ^c	665.406	536.363
UGT2B15	NP_001067	St	SVINDPVYK ^b	9 ^b	-	-	517.8 ^b	310.176 ^b	621.324	735.367	848.451 ^b
		IS	SVINDPVYK ^b	9 ^b	7 ^b	V ^b	520.8 ^b	310.176 ^b	627.338	741.381	854.465 ^b
UGT2B17	NP_001068	St	SVINDPIYK ^b	9 ^b	-	-	524.8 ^b	862.467 ^b	520.313 ^b	749.383 ^b	300.192
		IS	SVINDPIYK ^b	9 ^b	9 ^b	K ^b	528.8 ^b	870.481 ^b	528.327 ^b	757.397 ^b	300.192
Others											
P450R	NP_000932	St	IQTLTSSVR ^b	9 ^b	-	-	502.8 ^b	763.431 ^b	549.299 ^b	448.251	343.198
		IS	IQTLTSSVR ^b	9 ^b	8 ^b	V ^b	505.8 ^b	769.445 ^b	555.313 ^b	454.265	343.198
villin-1	NP_009058	St	DPETPIIVVK ^b	10 ^b	-	-	555.8 ^b	668.471 ^b	769.518 ^b	246.181	345.250
		IS	DPETPIIVVK ^b	10 ^b	10 ^b	K ^b	559.8 ^b	676.485 ^b	777.533 ^b	254.196	353.264
γ-GTP	NP_038347	St	QGFPVGK	7	-	-	366.7	400.256	303.203	547.324	604.346
		IS	QGFPVGK	7	7	K	370.7	408.270	311.217	555.338	612.360

Four SRM/MRM transitions (Q1/TOF-1, Q1/TOF-2, Q1/TOF-3, and Q1/TOF-4) were set for each peptide, and consisted of the m/z value of the precursor ion (Q1) and the m/z range of $m/z \pm 0.025$ for the four product ions (TOF-1, TOF-2, TOF-3, and TOF-4). The m/z values of Q1 were used to measure the target peptides in the MRM-HR mode of the TripleTOF5600. The four transitions were used by the MultiQuant software (AB SCIEX) to extract the data of the target peptides from the raw data obtained in the MRM-HR analysis and to quantify them. ^{13}C and ^{15}N were used for amino acid labeling in the internal standard peptides. The quantitative conditions marked with a, b, and c were taken from the previous reports Uchida et al. (2015), Miyauchi et al. (2016), and Lloret-Linares et al. (2013), respectively. The other quantitative conditions were determined in the present study. The amino acid sequence of probe peptide is specific for the target molecule, but is often common among its isoforms. AA, amino acid; St, standard; Is, internal standard.

統計解析

マウス及びサルの十二指腸，空腸及び回腸の発現量比較 (3 群) の統計学的有意差は，一元配置分散分析後に Tukey's post hoc test を行い，有意差検定を行った．それ以外の発現量比較 (2 群) の統計学的有意差は，Student's t-test で解析した．いずれも， $p < 0.05$ の場合に有意差が認められると判定した．

第2節 マウス小腸における P-gp/mdr1a 輸送活性の再構築

実験材料

マウス mdr1a 遺伝子を LLC-PK1 細胞にトランスフェクションした安定発現株 (L-mdr1a) 細胞は, Alfred H. Schinkel 博士 (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands) によって供与され, ライセンス契約のもと使用した. その他の試薬については, 特に記載が無い限り, いずれも市販の特級品を用いた.

L-mdr1a 細胞の plasma membrane 画分の調製及び mdr1a タンパク質発現量測定

L-mdr1a 細胞は, 既報 (Uchida et al., 2011a) に従いトランスウェルインサート上で培養し, 培養4日後に細胞を回収した. 回収した細胞を $230 \times g$, 5min, $4^{\circ}C$ の条件下で遠心分離し, 1% (v/v) protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO) を含んだ suspension buffer 細胞懸濁液を細胞懸濁液を窒素ガス細胞粉碎器に移し nitrogen cavitation 法 (450 psi, 15 min, $4^{\circ}C$) によって細胞を破碎した. 以降の操作は, 第1節で記載した小腸上皮細胞の細胞膜画分の調製及び LC-MS/MS を用いた mdr1a タンパク質定量方法と同様である.

統計解析

全てのデータは, 平均 \pm SEM として表した. $\text{in vitro PS}_{a \text{ to } b} \text{ ratio}$, 再構築した $\text{in situ PS}_{a \text{ to } b} \text{ ratio}$ 及び effective absorption ratio の SEM 値は, 既報 (Uchida et al., 2011a) に記載された誤差伝播の法則に従って算出した.

第3節 ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を用いたプロドラッグの加水分解性及び薬物吸収予測

実験材料

ヒト iPS 細胞株 (TkDA3-4) は、既報 (Takayama et al., 2010) によって樹立され、大津 真 博士 (The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan) から供与され、ライセンス契約のもと使用した。ヒト iPS 細胞を使用した研究は、塩野義製薬株式会社の研究倫理委員会及び生物安全委員会の承認のもと実施した。Caco-2 細胞株は、American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) から購入した。ヒト成人 (5 ドナー; 20-61 歳) 小腸及び胎児 (1 ドナー; 懐胎 26 週) 小腸由来 total RNA は、それぞれ Clontech (Palo Alto, CA, USA) 及び BioChain Institute Inc. (Newark, CA, USA) から購入した。エステル型プロドラッグ 6 化合物及びその活性体は、塩野義製薬株式会社で創製された抗インフルエンザ薬候補化合物であり、これらのプロドラッグは、共通の活性体に加水分解される (Figure 6-1)。その他の試薬については、特に記載が無い限り、いずれも市販の特級品を用いた。

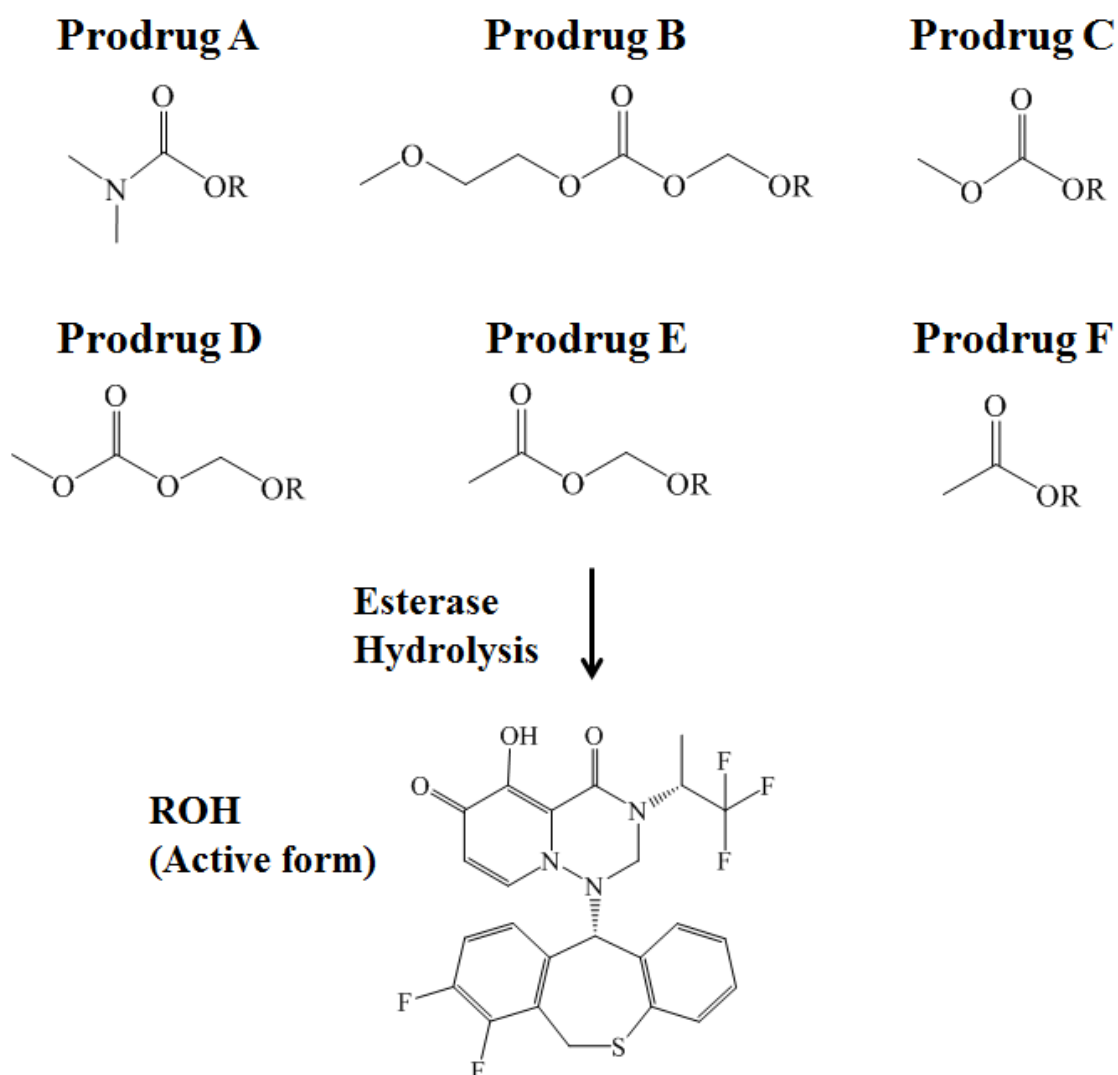


Figure 6-1. Structures of six ester prodrugs and their hydrolysis into the active form by esterase. Six ester prodrugs (prodrugs A, B, C, D, E, and F) and their active form (ROH), the candidates of anti-influenza virus agents, are in-house compounds synthesized by Shionogi & Co., Ltd. These six prodrugs are all hydrolyzed into the same active form (ROH).

動物

8 週齢のオスの Sprague-Dawley (SD) ラットは、日本クレア株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。ラットは、自由に水及び固形飼料を摂取させ、12 hr の明/暗サイクルの温度及び湿度制御された環境で飼育し、化合物投与試験 3 日前に麻酔下で頸静脈にカニュレーションチューブを挿入した。全ての動物実験は、塩野義製薬株式会社の動物実験適正運用委員会の承認のもと実施した。

ヒト iPS 細胞の培養

未分化のヒト iPS 細胞は、mitomycin C 処理したマウス胚線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast; MEF) のフィーダー細胞膜上でヒト iPS 細胞維持培地 [基礎培地; DMEM/F-12 (Sigma), 添加因子; 20% (v/v) Knockout Serum Replacement (KSR) (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA), 0.8% (v/v) MEM Non-Essential Amino Acids (NEAA) solution (Thermo Fisher Scientific), 1% (v/v) L-Glutamine–Penicillin–Streptomycin solution (Sigma), 100 μ M β -mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific) 及び 5 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF; ReproCell, Yokohama, Japan)] を用いて、37°C, 加湿空気 (5% CO₂ / 95% air) 条件下で毎日培地交換して行った。

ヒト iPS 細胞から小腸オルガノイドへの分化誘導

ヒト iPS 細胞は、既報 (Spence et al., 2011) に従い、内胚葉、さらに後腸への分化誘導を介して、小腸オルガノイドを作製した。

ヒト iPS 細胞の維持培地に最終濃度 10 μ M となるように Y27632 (Wako) を添加し、1 hr インキュベートした。その後、フィーダー細胞を dissociation solution (ReproCELL) で除去後、accutase (Innovative Cell Tech, San Diego, CA, USA) でヒト iPS 細胞を剥離した。回収したヒト iPS 細胞は、Corning Matrigel hESC-

Qualified matrix (Corning Inc., Corning, NY, USA) でコーティングした 24 well プレート (Corning Inc.) に 3.0×10^5 cells/well の密度で播種し, 10 μ M の Y27632 を含んだヒト iPS 細胞維持培地で 24 hr 培養した.

翌日から 3 日間, 内胚葉分化誘導培地 [基礎培地; RPMI 1640 medium (Thermo Fisher Scientific), 添加因子; 100 ng/mL Activin A (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin-streptomycin 及び FBS (Equitech-bio, Kerrville, TX, USA) (1 日目; 0%, 2 日目; 0.2%, 3 日目; 2%)] で毎日培地交換し, ヒト iPS 細胞から内胚葉への分化誘導を促した. さらに, 分化誘導した内胚葉を 4 日間, 後腸分化誘導培地 [基礎培地; RPMI 1640 medium, 添加因子; 500 ng/ml Wnt3a (R&D systems), 500 ng/ml fibroblast growth factor 4 (FGF4; R&D systems), 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin-streptomycin 及び 2% FBS] で毎日培地交換し, 内胚葉から後腸への分化誘導を促した.

分化誘導した後腸をセルスクレーパーで回収し, 500 ng/ml R-Spondin 1, 100 ng/ml Noggin 及び 50 ng/ml epidermal growth factor (EGF) を含んだ 55 μ l の Corning Matrigel Basement Membrane Matrix (Corning Inc.) に包埋し, Nunclon delta surface tissue culture dishes (Thermo Fisher Scientific) 上に滴下した. 37°C でマトリゲル (Corning Inc.) を固めた後, 小腸分化誘導培地 [基礎培地; Advanced DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific), 添加因子; 500 ng/ml R-spondin 1 (R&D systems), 100 ng/ml Noggin (R&D systems), 50 ng/ml EGF (R&D systems), 2 mM L-glutamine (Thermo Fisher Scientific), 100 units/ml penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific), 15 mM HEPES (Thermo Fisher Scientific) 及び 2% (v/v) B27 supplement (Thermo Fisher Scientific)] で 51-69 日間, 3 日おきに培地交換しながら培養し, 後腸から小腸オルガノイドへ分化誘導した. なお, 初めの 3 日間は, 最終濃度 10 μ M となるように Y27632 (Wako) を添加し, それ以降は加えな

かった．全ての培養は，37°C，加湿空気 (5% CO₂ / 95% air) 条件下で毎日培地交換して行った．

小腸オルガノイドから小腸上皮細胞の単離

小腸上皮細胞は，上皮細胞マーカーである CD326 (epithelial cell adhesion molecule; EpCAM) の磁気ビーズ抗体を用いた MACS 法によって単離した．

小腸オルガノイドの培地中に最終濃度 10 μ M となるように Y27632 を添加し 1 hr インキュベートした．PBS で 1 回洗浄し，小腸オルガノイドをチューブに回収後，2 mM EDTA 及び 1 mM dithiothreitol (Sigma) が含まれる PBS 中で 30 min，4°C 条件下でインキュベートした．細胞懸濁液を 260 \times g, 4 min，室温条件下で遠心分離し，得られたペレットに対して，Dispase II (Roche, Mannheim, Germany), 1% FBS 及び 10 μ M Y27632 を含んだ DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) で 20 min, 37°C 条件下でインキュベートした．細胞を 70 μ m のセルストレーナー (Corning Inc.) を通した後，260 \times g, 4 min，室温条件下で遠心分離した．得られたペレットに対して，以降の MACS 操作で非特異的な抗体の吸着を防ぐために，2% (v/v) FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を含む MACS buffer (0.1 mM EDTA 及び 0.5% BSA を含む PBS) 500 μ L で懸濁し，10 min, 4°C 条件下でインキュベートした．さらに，125 μ L の EpCAM MicroBeads (Miltenyi Biotec) を添加し，15 min, 4°C 条件下でインキュベートした．10 mL の MACS buffer を添加後，260 \times g, 4 min，室温条件下で遠心分離した．得られたペレットに対して，MACS buffer 500 μ L で再懸濁後，MACS magnetic holder (Miltenyi Biotec) に取り付けた MACS カラム (Miltenyi Biotec) 上に添加し，4 mL の MACS buffer を 3 回通過させた．MACS カラムを MACS magnetic holder から取り外し，5 mL の MACS buffer を添加し，プランジャーで押し込むことで，EpCAM 陽性細胞をチューブに回収した．細胞懸濁液を 260 \times g, 4 min，室温条件下で遠心分離し，得られたペレットに対して，既報

(Sato et al., 2011) を参考に作製した小腸維持培地 [基礎培地; Advanced DMEM/F12, 添加因子; 500 ng/ml R-spondin 1, 100 ng/ml Noggin, 50 ng/ml EGF, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin-streptomycin, 15 mM HEPES, 2% (v/v) B27 supplement, 1% N2 supplement (Thermo Fisher Scientific), 1 mM N-acetylcysteine (Sigma), 10 nM human gastrin 1 (Peptide Institute, Osaka, Japan) 及び 500 nM A-83-01 (Tocris, Bristol, UK)] で再懸濁した. 得られた細胞懸濁液を 0.5 mg/ml laminin 511-E8 (iMatrix-511; Nippi, Tokyo, Japan) コーティングした 24 well 多孔性ポリエステル膜トランズウェルインサート (0.4 μm pore size and 0.33 cm^2 filter area, Corning Inc.) 上に 3.0×10^5 cells/ cm^2 の密度で播種し, 2-3 日おきに培地交換をし, 20-22 日間培養した. なお, 初めの 3 日間は, 最終濃度 10 μM となるように Y27632 (Wako) を添加し, それ以降は加えなかった. 全ての培養は, 37°C, 加湿空気 (5% CO_2 / 95% air) 条件下で行った.

Caco-2 細胞の培養

Caco-2 細胞は, 10% FBS, 1% NEAA, 100 units/ml penicillin-streptomycin 及び 6 mM HEPES を含んだ DMEM (Thermo Fisher Scientific) 培地で培養した. 細胞は, trypsin (0.25%)-EDTA (1 mM) で剥離し, 24 well Transwell insert 上に 1.3×10^5 cells/ cm^2 の密度で播種した. 2-3 日おきに培地交換をし, 21 日間培養した. 全ての培養は, 37°C, 加湿空気 (5% CO_2 / 95% air) 条件下で行った.

Transwell insert 上に播種した iPS 小腸及び Caco-2 細胞の膜電気抵抗値の測定

iPS 小腸及び Caco-2 細胞の抵抗値 (Ω) は, Millicell[®] ERS-2 system (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) を使用して測定した. 細胞を播種していないトランズウェルインサートをバックグラウンド抵抗値として測定した. iPS 小腸及び Caco-2 細胞の膜電気抵抗値 (TEER; $\Omega \times \text{cm}^2$) は, 細胞を播種したウェルの抵

抗値 (Ω) からバックグラウンドの抵抗値 (Ω) を差し引いた値に対し、トランスウェルインサートの培養面積 (0.33 cm^2) を掛け合わせて算出した。

定量 PCR 法による遺伝子発現量解析

ヒト iPS 細胞, iPS 小腸及び Caco-2 細胞の total RNA は, PureLink[®] RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて抽出した。

(1) トランスポーター及び代謝酵素の遺伝子発現量解析

9 遺伝子 [P-gp, BCRP, PEPT1, CYP3A4, CYP3A7, CES1, CES2, UGT1A1 及び GAPDH (primer 1)] の定量 PCR は, TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用い, Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) で測定した。cDNA の合成は, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を使用した。反応溶液 [total RNA (10 μL), 10 \times RT buffer (2 μL), 10 \times RT random primers (2 μL), 25 \times dNTP Mix (100 mM) (0.8 μL), MultiScribe reverse transcriptase (50 units/ μL) (1 μL) 及び distilled water (4.2 μL)] を調製し, Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System を用いて, 25°C; 10 min, 37°C; 120 min, 85°C; 5 min の条件下で逆転写反応を行った。生成した cDNA サンプルを続けて定量 PCR 解析に供した。反応溶液 [cDNA (1 μL), TaqMan[®] primer-probe set (1 μL) (Applied Biosystems), 2 \times TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mix (10 μL) 及び distilled water (8 μL)] を調製し, Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System を用いて, 95°C; 10 sec, (95°C; 3 sec, 60°C; 30 sec) \times 50 cycles の条件下で PCR 反応を行った。用いた TaqMan[®] primer-probe セットは, Table 6-3 に記載した。各標的遺伝子の発現量は, GAPDH (primer 1) のそれで補正した相対発現量を算出する比較 ΔCt 法を使用した。 ΔCt は, 標的遺伝子の Ct 値を GAPDH の値で引くことで算出され, GAPDH に対する相対遺伝子発現量は, $2^{-\Delta\text{Ct}}$ として表した。

Table 6-3. Primer Information in Real-time RT-PCR using a TaqMan® Universal PCR Master Mix

Gege name	GenBank accession number	TaqMan Assay number
CYP3A4	NM_017460	Hs00430021_m1
CYP3A7	NM_000765	Hs00426361_m1
CES1	NM_001025195	Hs00275607_m1
CES2	NM_003869	Hs01077945_m1
UGT1A1	NM_000463	Hs02511055_s1
P-gp	NM_000927	Hs00184500_m1
BCRP	NM_004827	Hs01053790_m1
PEPT1	NM_005073	Hs00953898_m1
GAPDH (primer 1)	NM_002046	Hs02758991_g1

(2) 未分化細胞，内胚葉，後腸及び小腸マーカーの遺伝子発現量解析

トランスポーター及び代謝酵素の遺伝子発現量解析とは異なり，未分化細胞，内胚葉，後腸及び小腸マーカーの 15 遺伝子 [OCT3/4, SOX2, SOX17, FOXA2, GATA4, CDX2, LGR5, ISX, VIL, SI, LYZ, CHGA, MUC2, TFF3 及び GAPDH (primer 2)] は，cDNA への逆転写と PCR 増幅反応を 1 回の反応で行える One Step SYBR[®] PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) を使い，Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System で測定した．反応溶液 [total RNA (2 μ L), 10 μ M forward primer (0.4 μ M in reaction solution) (0.8 μ L), 10 μ M reverse primer (0.4 μ M in reaction solution) (0.8 μ L), 2 \times One Step SYBR[®] RT-PCR Buffer 4 (10 μ L), PrimeScript PLUS RTase Mix (0.4 μ L), TaKaRa Ex Taq HS Mix (1.2 μ L), 50 \times ROX Reference Dye II (0.4 μ L) 及び distilled water (4.4 μ L)] を調製し，Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System を用いて，42°C; 5 min, 95°C; 10 sec, (95°C; 5 sec, 60°C; 34 sec) \times 50 cycles の条件下で PCR 反応を行った．PCR 反応終了後，95°C; 15 sec, 60°C; 1 min の条件下で温度変化させた後，60-95°C まで 0.5°C ずつ上昇させ，融解曲線を作製した．用いたプライマーは，Table 6-4 に記載した．各標的遺伝子の発現量は，GAPDH (primer 2) のそれで補正した相対発現量を算出する比較 Δ Ct 法を使用した．

Table 6-4. Primer Information in Real-time RT-PCR using a One Step SYBR® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit

Gege name	GenBank accession number	Primer sequence	
		Sense (5'→3')	Antisense (5'→3')
OCT3/4	NM_002701	TGAAGCTGGAGAAGGAGAAGCTG	GCAGATGGTCGTTTGGCTGA
SOX2	NM_003106	TGAGCGCCCTGCAGTACAA	GCTGCGAGTAGGACATGCTGTAG
SOX17	NM_022454	CTGCAGGCCAGAAGCAGTGTTA	CCCAAACCTGTTCAAGTGGCAGA
FOXA2	NM_021784	GGTGTACTCCCGGCCCATTA	CAGAGTTAGCCGGGCCTGAA
GATA4	NM_001308093	TTACACGCTGATGGGACTGGAG	TCGGTGCTAGAAACACAATGCAA
CDX2	NM_001265	TTCACTACAGTCGCTACATCACC	CTGCGGTTCTGAAACCAGATT
LGR5	NM_003667	CAGCCATCAAGCAGGTGTTCA	ATGCTGGAATGTTTCAGGCTCA
ISX	NM_001303508	TCTCTAGCACCGCTGGATGAA	CTGCTACCCAAGTGATGAGCTACTG
VIL	NM_007127	GCTTGGCAACTCTAGGGACTGG	TGAGGTTGCTGTTAGCATTGAACAC
SI	NM_001041	AGACAACTATGCACGATGGGACAA	CATCCAGCGGGTACAGAGATGA
LYZ	NM_000239	GAGTTAACTCCACAACCTTGAACA	CCGTGATCCACAAGGCATTA
CHGA	HM_001275	TTGGAGAGCGAGGTCTTGGAG	TGCCTGTCAGCCAGGAATGT

MUC2	NM_002457	GATGCAAATGCTGGCATCAAAG	CAACCAGCACGTCATCCTGAA
TFF3	NM_003226	CTGCTGCTTTGACTCCAGGAT	CAGCTGGAGGTGCCTCAGAA
GAPDH	NM_002046	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
(primer 2)			

ヒト iPS 細胞, 内胚葉及び後腸の免疫染色

ヒト iPS 細胞, 内胚葉及び後腸について, PBS で洗浄後, 4% formaldehyde で 20 min 室温で固定した. 細胞を PBS で洗浄後, 0.1% Triton-X-100 及び 10% normal donkey serum (Jackson Immuno Research Labs., West Grove, PA, USA) を含んだ PBS で 45 min 室温でブロッキングした. PBS で洗浄後, 1 次抗体 [10 µg/mL に希釈した goat anti-human SOX17 antibody (R&D Systems; Cat. No. AF1924) または希釈済の mouse anti-human CDX2 antibody (BioGenex, San Ramon, CA, USA; Cat. No. AM392)] を添加し, 4°C で一晩反応させた. 1 次抗体反応後, 1 次抗体を除去し PBS で洗浄後, 2 次抗体 [1/500 に希釈した Alexa Fluor 455-labeled donkey anti-goat antibody (Invitrogen; Cat. No. A-11055) または 1/500 に希釈した Alexa Fluor 455-labeled donkey anti-mouse antibody (Invitrogen; Cat. No. A-31570)] を添加し, 1 hr 室温で反応させた. 2 次抗体反応後, 2 次抗体を除去し PBS で洗浄後, Hoechst 33342 (1.62 µM) を含んだ PBS を添加し, 15 min 室温で反応させた. 反応後, PBS で洗浄し, 最後に再度 PBS を添加し, BZ-X710 All-in-One fluorescence microscope (Keyence, Osaka, Japan) を用いて蛍光を観察した.

iPS 小腸及び Caco-2 細胞単層膜における経細胞輸送試験

MES transport buffer 及び HEPES transport buffer を経細胞輸送解析に使用した. Transport buffer の組成は, 1.26 mM CaCl₂, 0.493 mM MgCl₂, 0.407 mM MgSO₄, 5.33 mM KCl, 0.441 mM KH₂PO₄, 12.8 mM NaHCO₃, 138 mM NaCl, 0.338 mM Na₂HPO₄, 30.6 mM D-glucose, 5% FBS, 25 mM MES (MES transport buffer) または 25 mM HEPES (HEPES transport buffer) とした. MES transport buffer 及び HEPES transport buffer の pH は, それぞれ NaOH または HCl を用いて 6.0 及び 7.4 に調製した. iPS 小腸及び Caco-2 細胞単層膜における経細胞輸送試験の条件は, 以下の(1)-(5)に記載した.

(1) iPS 小腸における P-gp 及び BCRP の活性測定

P-gp 及び BCRP の機能は、頂端膜から基底側膜及び基底側膜から頂端膜の両方向の経細胞輸送試験によって解析した。 [³H]digoxin (1 μM, 1.0 μCi/ml) 及び cyclosporin A (10 μM) は、それぞれ P-gp の基質及び阻害剤として使用し、sulfasalazine (2 μM) 及び KO143 (0.1 μM) は、それぞれ BCRP の基質及び阻害剤として使用した。輸送試験開始前に、ドナー側及びレシーバー側の各トランスポーターの阻害剤を含む、もしくは、含まない HEPES transport buffer で 30 min プレインキュベートした。プレインキュベーション後、各トランスポーターの阻害剤を含む、もしくは、含まない HEPES transport buffer に対して、ドナー側はさらに基質を含み、レシーバー側は基質を含まない transport buffer に置換して、経細胞輸送試験を開始した。輸送試験は、水平回転攪拌機 (MMS-1, EYELA, Tokyo, Japan) で緩やかに攪拌しながら 37°C でインキュベートして行った。反応開始から 1, 2 及び 3 hr 後にレシーバー側から一定量の溶液を回収した。3 hr のサンプリング以外は、同量の基質が含まれていない HEPES transport buffer を添加した。

試験化合物の膜透過係数 (P_{app}) (cm/sec) は次の式で算出される：

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0} \quad (\text{Eq. 6-4})$$

ここで、 dQ/dt (pmol/sec) は、試験化合物の単層膜透過速度を表し、レシーバー側への累積透過量を y 軸に、反応時間を x 軸にプロットした際に傾きを線形回帰によって算出される。A は、単層膜の培養表面積 (0.33 cm²) を表し、 C_0 (pmol/μL) は、ドナー側に添加した試験化合物の初期濃度を示す。

P-gp 及び BCRP の輸送活性は、以下の式によって算出した。

$$\text{Efflux ratio} = \frac{P_{\text{app, b to a}}}{P_{\text{app, a to b}}} \quad (\text{Eq. 6-5})$$

ここで、 $P_{\text{app, b to a}}$ (cm/sec) 及び $P_{\text{app, a to b}}$ (cm/sec) は、それぞれ基底側膜から頂端膜方向及び頂端膜から基底側膜方向の膜透過係数を表す。

(2) iPS 小腸における PEPT1 の活性測定

PEPT1 の活性は、頂端膜から基底側膜方向の経細胞輸送試験によって解析した。Transport buffer は、頂端膜側は MES transport buffer、基底側膜側は HEPES transport buffer を使用した。 $[^{14}\text{C}]$ glycylsarcosine (10 μM , 1.0 $\mu\text{Ci/ml}$) を PEPT1 の基質として使用し、その輸送活性が高濃度 (10 mM) の放射能標識されていない glycylsarcosine によって阻害されるか調べた。輸送試験開始前に、頂端膜側及び基底側膜側に阻害剤を含む、もしくは、含まない各 transport buffer で 30 min プレインキュベートした。プレインキュベーション後、阻害剤を含む、もしくは、含まない各 transport buffer に対して、ドナー側はさらに基質を含み、レシーバー側は基質を含まない transport buffer に置換して、経細胞輸送試験を開始した。輸送試験は、水平回転攪拌機 (MMS-1, EYELA, Tokyo, Japan) で緩やかに攪拌しながら 37°C でインキュベートして行った。反応開始から 1, 2 及び 3 hr 後に基底側膜側から一定量の溶液を回収した。3 hr のサンプリング以外は、同量の基質が含まれていない HEPES transport buffer を添加した。 $[^{14}\text{C}]$ glycylsarcosine の膜透過計数は、Eq. 6-4 に従って算出した。

(3) iPS 小腸及び Caco-2 細胞単層膜における CYP3A4, CES2 及び CES1 の代謝活性測定

CYP3A4, CES2 及び CES1 の代謝活性は、頂端膜から基底側膜方向の経細胞輸

送試験によって解析した。サンプリング時間以外は、(2) で記載した方法と同様の条件で行った。CYP3A4 の機能解析では 2 μM midazolam 及び 0.5 μM , 10 μM ketoconazole を CYP3A4 の基質及び阻害剤，CES2 の機能解析では 100 μM irinotecan 及び 100 μM telmisartan を CES2 の基質及び阻害剤，CES1 の機能解析では 100 μM temocapril 及び 500 μM BNPP を CES1 の基質及び阻害剤として使用した。輸送試験開始前に、各代謝酵素阻害剤を含む、もしくは、含まない transport buffer で 30 min プレインキュベートした。プレインキュベーション後、阻害剤を含む、もしくは、含まない各 transport buffer に対して、ドナー側はさらに基質を含み、レシーバー側は基質を含まない transport buffer に置換して、経細胞輸送試験を開始した。反応開始 2 hr 後、頂端膜及び基底側膜側から一定量の溶液を回収し、さらに細胞を HEPES transport buffer で洗浄した後、acetonitrile を細胞に添加し、細胞内に含まれる試験化合物を抽出した。

既報 (Fisher et al., 1999) に従い、各細胞単層膜の薬物透過に対する薬物代謝の寄与は extraction ratio (%) で定義され、以下の式で算出した。

$$\text{Extraction ratio} = \frac{\sum \text{metabolite}_{(\text{AP, BL, Cell})}}{\sum \text{parent}_{(\text{BL, Cell})} + \sum \text{metabolite}_{(\text{AP, BL, Cell})}} \times 100 \quad (\text{Eq. 6-6})$$

ここで、 $\sum \text{parent}_{(\text{BL, Cell})}$ (pmol) は、試験終了時における親化合物 (midazolam, irinotecan 及び temocapril) の基底側膜側 (BL) 及び細胞内 (Cell) に含まれる総量を表す。 $\sum \text{metabolite}_{(\text{AP, BL, Cell})}$ (pmol) は、試験終了時における代謝物 (1-OH midazolam, SN38 及び temocaprilat) の頂端膜側 (AP), 基底側膜側及び細胞内に含まれる総量を表す。

(4) iPS 小腸単層膜におけるエステルプロドラッグ 6 化合物の加水分解活性解析

iPS 小腸単層膜における加水分解試験は、(3) と同様の方法で行った。各プロドラッグの固有クリアランス (CL_{int}) ($\mu\text{L}/\text{min}$) は、以下の式で算出した。

$$CL_{int} = \frac{\sum AF_{(AP, BL, Cell)} / t}{C_{0, PD(AP)}} \quad (\text{Eq. 6-7})$$

ここで、反応終了時における $\sum AF_{(AP, BL, Cell)}$ (pmol) は、頂端膜側 (AP), 基底側膜側 (BL) 及び細胞内 (Cell) の活性体の総量を表す。t は、反応時間 (120 min) を表し、 $C_{0, PD(AP)}$ は、頂端膜側に添加した試験プロドラッグの初期濃度 (pmol/ μL) を表す。

(5) iPS 小腸単層膜における薬物 14 化合物の膜透過性とヒト Fa 値との比較

薬物 14 化合物 (ganciclovir, doxorubicin, [^{14}C]mannitol, famotidine, sulpiride, atenolol, sulfasalazine, furosemide, ranitidine, hydrochlorothiazide, [^3H]digoxin, acetaminophen, propranolol 及び antipyrine) の頂端膜から基底側膜方向の膜透過係数は、サンプリング時間以外は(2) と同様の方法で算出した。Ganciclovir, doxorubicin, [^{14}C]mannitol, sulfasalazine 及び [^3H]digoxin の試験濃度は、それぞれ 100 μM , 2 μM , 10 μM (20 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$), 2 μM 及び 1 μM (1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) とし、それ以外の 9 化合物 (famotidine, sulpiride, atenolol, furosemide, ranitidine, hydrochlorothiazide, acetaminophen, propranolol 及び antipyrine) の試験濃度は 10 μM とした。Propranolol 及び antipyrin の透過試験のサンプリング時間は、30, 60 及び 90 min とし、それ以外の 12 化合物のサンプリング時間は、1, 2 及び 3 hr とした。ヒト Fa 値の臨床実測値は、3 種の文献 (Zhao et al., 2001; Sugano et al., 2002; Varma et al., 2010) の報告値を引用し、報告値が複数ある場合は、その最大値と最小値の中間値を計算し使用した (Table 4-2)。

ラットにおけるエステルプロドラッグの体内動態試験

エステルプロドラッグ 6 化合物の経口投与試験では、活性体として 1 mg/5 mL/kg の投与濃度となるように 0.5% (w/v) methylcellulose 400 cP の投与媒体で投与溶液を調製し、ラットに経口投与した (n=2 or 3). ラットは、継時採血を行うために試験 3 日前に isoflurane 麻酔下で頸静脈をカニューレーション処置した. 血液サンプルは、頸静脈からヘパリン処理したシリンジを用いて、投与 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 及び 24 hr 後に回収した.

活性体の静脈投与試験では、1 mg/1 mL/kg の投与濃度となるように dimethyl acetamide : propylene glycol solution (1:1, v/v) の投与媒体で投与溶液を調製し、ラットに尾静脈投与した (n = 3). 血液サンプルは、頸静脈からヘパリン処理したシリンジを用いて、投与 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 及び 24 hr 後に回収した.

回収した血液サンプルは、1,310 × g, 10 min, 4°C の条件下で遠心分離し、上清を血漿サンプルとして回収した. 血漿サンプルは、LC-MS/MS で化合物測定を行うまで -20°C で保存した. 活性体の血漿中濃度に関する PK パラメータは、WinNonlin 5.0 software (Pharsight, Mountain View, CA) を用いて解析した. C_{max} (ng/mL) は、経口投与後のサンプリング時間 (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 及び 24 hr) のうち、最大の血漿中濃度を示す濃度とした. AUC (ng × hr/mL) は、台形則に従って算出した. BA (%) は、以下の式で算出した.

$$BA = \frac{AUC_{p.o.} / Dose_{p.o.}}{AUC_{i.v.} / Dose_{i.v.}} \times 100 \quad (\text{Eq. 6-8})$$

ここで、 $AUC_{p.o.}$ 及び $Dose_{p.o.}$ は、プロドラッグ経口投与試験における活性体の AUC (ng × hr/mL) 及びプロドラッグの投与量 (活性体として 1 mg/kg) を示す. $AUC_{i.v.}$ 及び $Dose_{i.v.}$ は、活性体静脈投与試験における活性体の AUC (ng × hr/mL)

及び投与量 (1 mg/kg) を示す.

エステルプロドラッグ 6 化合物の iPS 小腸における CL_{int} と in vivo 小腸吸収の比較における薬物速度論

iPS 小腸におけるエステルプロドラッグ 6 化合物の CL_{int} は, 薬物速度論に従うと, 以下の式に変換できる.

$$CL_{int} = PS_{a, inf}(PD) \times \frac{CL_{hydro}(PD)}{PS_{a, eff}(PD) + PS_{b, eff}(PD) + CL_{hydro}(PD)} \quad (Eq. 6-9)$$

ここで, PS_{a, inf}(PD) (μL/min), PS_{a, eff}(PD) (μL/min) 及び PS_{b, eff}(PD) (μL/min) は, それぞれプロドラッグの頂端膜側の取り込み, 頂端膜側の排出及び基底側膜側の排出における PS product (膜透過係数と小腸上皮細胞膜表面積の積) を表す. CL_{hydro}(PD) (μL/min) は, 小腸上皮細胞内でのプロドラッグから活性体への加水分解クリアランスを表す.

Scheme 4-1 で示すように, CL_{int} の式は, 1) プロドラッグが細胞内に移行する過程 2) 細胞内でプロドラッグが活性体へと加水分解される過程の 2 つの過程を反映する. 一方, 小腸吸収過程では, この 2 つの過程に加えて, 3) 生成した活性体が細胞内から門脈中に流入する過程が含まれる. CL_{a to b} (PD to AF) (μL/min) を小腸上皮細胞透過を介して頂端膜側のプロドラッグが基底側膜側に活性体として変換される際のクリアランスと定義すると, CL_{a to b} (PD to AF) (μL/min) は, 前述した 3 つの過程を反映し, 以下の式で表される.

CL_{a to b} (PD to AF)

$$= PS_{a,inf(PD)} \times \frac{CL_{hyd(PD)}}{PS_{a,eff(PD)} + PS_{b,eff(PD)} + CL_{hyd(PD)}} \times \frac{PS_{b,eff(AF)}}{PS_{a,eff(AF)} + PS_{b,eff(AF)}} \quad (\text{Eq.6-10})$$

ここで、 $PS_{a,eff(AF)}$ ($\mu\text{L}/\text{min}$) 及び $PS_{b,eff(AF)}$ ($\mu\text{L}/\text{min}$) は、それぞれ活性体の頂端膜及び基底側膜側の排出の PS product を表す。

従って、Eq. 6-10 は、Eq. 6-9 により Eq. 6-11 に変換される。

$$CL_{a \rightarrow b(PD \rightarrow AF)} = CL_{int} \times \frac{PS_{b,eff(AF)}}{PS_{a,eff(AF)} + PS_{b,eff(AF)}} = CL_{int} \times \alpha \quad (\text{Eq. 6-11})$$

上記の α の値は、細胞内で生成した活性体が basolateral 側へ移行する過程を反映している。本研究で使用したプロドラッグ 6 化合物は、全て共通の活性体に加水分解されるため、Eq. 6-11 の α の値は、プロドラッグ 6 化合物間で共通である。

液体シンチレーションカウンターを用いた放射能測定

放射体標識された化合物 ($[^{14}\text{C}]$ mannitol, $[^3\text{H}]$ digoxin 及び $[^{14}\text{C}]$ glycylsarcosine) のサンプルは、Pico-Fluor Plus (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) と混合し、液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 3100TR; PerkinElmer) で放射能測定を行った。

LC-MS/MS を用いた試験化合物測定

放射体標識された化合物以外の試験化合物のサンプル濃度は、LC-MS/MS を用いて測定した。試験サンプルは、測定まで -20°C で保存した。iPS 小腸及び Caco-2 細胞における経細胞輸送試験のサンプルは、6 倍量の acetonitrile を添加し、ラ

ット PK 試験のサンプルは、12.5 倍量の acetonitrile を添加した。Acetonitrile 添加後のサンプルは、 $1,880 \times g$, 5 min, 4°C の条件下で遠心分離し、得られた上清を LC-MS/MS で測定した。詳細な LC-MS/MS の条件は、Table 6-5 に記載した。ピーク解析は、Analyst software version 1.6 (AB SCIEX) または MassLynx software version 4.1 (Waters) を使用した。

Table 6-5. Conditions for LC-MS/MS analysis.

Compound	LC conditions					MS conditions	
	Instrument, column	Mobile phase		Gradient condition Time (min); B concentration %	Flow rate (mL/min)	Instrument, Ionization Mode	SRM transition (m/z)
		A	B				
Transcellular transport studies across hiPSC-IECs							
Sulfasalazine	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.20 min; 20% → 0.50-0.90 min; 60% → 0.91-1.10 min; 95% → 1.11-1.40 min; 20%	0.75	1, Positive	399.1 /223.1
Midazolam	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.20 min; 20% → 0.50-0.90 min; 60% → 0.91-1.10 min; 95% → 1.11-1.40 min; 20%	0.75	1, Positive	326.1 /291.1
1-OH Midazolam	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.20 min; 20% → 0.50-0.90 min; 60% → 0.91-1.10 min; 95% → 1.11-1.40 min; 20%	0.75	1, Positive	342.1 /203.1
Irinotecan	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.20 min; 20% → 0.50-0.90 min; 60% → 0.91-1.10 min; 95% → 1.11-1.40 min; 20%	0.75	1, Positive	587.2 /543.1

SN38	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.20 min; 5% → 0.30-0.90 min; 40% → 0.91-1.10 min; 95% → 1.11-1.40 min; 5%	0.75	1, Positive	393.2 /263.0
Temocapril	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.10 min; 40% → 0.40-0.70 min; 80% → 0.71-0.90 min; 95% → 0.91-1.20 min; 40%	0.75	1, Positive	477.1 /270.0
Temocaprilat	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.10 min; 5% → 0.30-0.70 min; 70% → 0.71-0.90 min; 95% → 0.91-1.20 min; 5%	0.75	1, Positive	449.2 /190.1
Ganciclovir	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.10 min; 5% → 0.50-0.70 min; 20% → 0.71-0.90 min; 95% → 0.91-1.20 min; 5%	0.75	1, Positive	256.1 /152.1
Doxorubicin	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.10 min; 5% → 0.50-0.70 min; 90% → 0.71-0.90 min; 95% → 0.91-1.20 min; 5%	0.75	1, Positive	544.2 /397.0
Famotidine	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.20 min; 5% → 0.90-1.10 min; 95% → 1.11-1.40 min; 5%	0.75	1, Positive	338.0 /189.1
Sulpiride	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.10 min; 5% → 0.50-0.70 min; 60% → 0.71-0.90 min; 95% → 0.91-1.20 min; 5%	0.75	1, Positive	342.1 /112.1
Atenolol	1, 2	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.20 min; 5% → 0.60-0.70 min; 80% → 0.71-1.00 min; 95% → 1.01-1.30 min; 5%	0.75	1, Positive	267.2 /190.1

Furosemide	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.10 min; 20% → 0.60-0.90 min; 60% → 0.91-1.10 min; 95% → 1.11-1.40 min; 20%	0.75	1, Negative	329.0 /284.9
Ranitidine	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.10 min; 5% → 0.50-0.70 min; 80% → 0.71-0.90 min; 95% → 0.91-1.20 min; 5%	0.75	1, Positive	315.1 /130.1
Hydrochlorothiazide	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.10 min; 5% → 0.50-0.70 min; 80% → 0.71-0.90 min; 95% → 0.91-1.20 min; 5%	0.75	1, Negative	295.9 /268.9
Acetaminophen	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.10 min; 5% → 0.50-0.70 min; 80% → 0.71-0.90 min; 95% → 0.91-1.20 min; 5%	0.75	1, Positive	152.1 /110.1
Propranolol	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.10 min; 25% → 0.60-0.70 min; 60% → 0.71-0.90 min; 95% → 0.91-1.20 min; 25%	0.75	1, Positive	260.2 /183.1
Antipyrine	1, 1	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.20 min; 5% → 0.50-0.80 min; 80% → 0.81-1.00 min; 95% → 1.01-1.30 min; 5%	0.75	1, Positive	189.1 /56.1
Prodrug A	1, 3	0.1 % FA in water	MeCN	0-1.30 min; 50% → 0.31-1.50 min; 95% → 1.51-1.80 min; 50%	0.55	1, Positive	595.1 /247.0

Prodrug B	1, 3	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.80 min; 53% → 0.81-1.30 min; 95% → 1.31-1.60 min; 53%	0.75	1, Positive	656.2 /247.0
Prodrug C	1, 3	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.80 min; 53% → 0.81-1.30 min; 95% → 1.31-1.60 min; 53%	0.75	1, Positive	582.1 /247.1
Prodrug D	1, 3	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.80 min; 53% → 0.81-1.30 min; 95% → 1.31-1.60 min; 53%	0.75	1, Positive	612.1 /247.1
Prodrug E	1, 3	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.80 min; 53% → 0.81-1.30 min; 95% → 1.31-1.60 min; 53%	0.75	1, Positive	596.1 /247.0
Prodrug F	1, 3	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.80 min; 53% → 0.81-1.30 min; 95% → 1.31-1.60 min; 53%	0.75	1, Positive	566.4 /247.1
Active form (condition 1)	1, 3	0.1 % FA in water	MeCN	0-1.30 min; 50% → 0.31-1.50 min; 95% → 1.51-1.80 min; 50%	0.55	1, Positive	524.1 /247.1
Active form (condition 2)	1, 3	0.1 % FA in water	MeCN	0-0.80 min; 53% → 0.81-1.30 min; 95% → 1.31-1.60 min; 53%	0.75	1, Positive	524.1 /247.1
Pharmacokinetics studies in rat							

Active form (condition 3)	2, 4	0.1 % FA / 0.05 % AA in water	MeCN	0-0.90 min; 50% → 0.90-1.10 min; 95% → 1.11-1.40 min; 50%	0.75	2, Positive	524.0 /247.0
Active form (condition 4)	2, 4	0.1 % FA / 0.05 % AA in water	MeCN	0-0.20 min; 35% → 0.50-0.90 min; 60% → 0.90-1.10 min; 95% → 1.11-1.40 min; 35%	0.75	3, Positive	524.0 /247.0
Active form (condition 5)	2, 4	0.1 % FA / 0.05 % AA in water	MeCN	0 min; 45% → 0.60-0.80 min; 75% → 0.81-1.00 min; 45%	0.75	3, Positive	524.0 /247.0

Compounds were quantified by coupling a triple quadrupole mass spectrometer to a high-performance liquid chromatography (HPLC) or ultra-performance liquid chromatography (UPLC) system. Compounds were separated and eluted from the column under gradient conditions of mobile phase A and B; mobile phase A consisted of either 0.1 % of formic acid (FA) in water or 0.1% of FA and 0.05% acetylacetone (AA) in water, and mobile phase B consisted of acetonitrile (MeCN). The eluted compounds were detected by electrospray ionization using selected reaction monitoring (SRM) modes. The LC instruments used were either a Nexera X2 UHPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan; LC instrument 1) or an Acquity UPLC system (Waters; LC instrument 2). The LC columns used were YMC-Triart C18

column (2.1 mm × 50 mm, i.d., 3 µm; YMC, Ltd., Kyoto, Japan; column 1), CAPCELL PAK ADME column (2.1 mm × 50 mm, i.d., 3 µm; Shiseido, Tokyo, Japan; column 2), L-column ODS (2.1 mm × 50 mm, i.d., 3 µm; Chemicals Inspection and Institute, Tokyo, Japan; column 3), or Acquity UPLC BEH C18 column (2.0 mm or 2.1 mm × 50 mm, i.d., 1.7 µm; Waters; column 4), and the all column temperatures were set at 40 C. The MS instruments used were a Triple Quad 6500 triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer (AB SCIEX; MS instrument 1), Quattro Ultima Pt (Waters; MS instrument 2), and API-5000 (AB SCIEX; MS instrument 3). The active form was measured under the following conditions. For the hydrolysis studies of prodrugs in hiPSC-IECs, condition 1 was employed in the study of prodrug A and condition 2 was employed in the studies of prodrugs B, C, D, E, and F. For the oral administration studies of prodrugs in rat, condition 3 was employed in the studies of prodrugs A and C, condition 4 was employed in the studies of prodrugs B, E, and F, and condition 5 was employed in the study of prodrug D. For the intravenous administration study of the active form in rat, condition 5 was employed.

統計解析

2 群の統計学的有意差は，Student's t-test で解析し， $p < 0.05$ の場合に有意差が認められると判定した．

引用文献

- Achler C, Filmer D, Merte C and Drenckhahn D (1989) Role of microtubules in polarized delivery of apical membrane proteins to the brush border of the intestinal epithelium. *J Cell Biol* **109**:179-189.
- Adachi Y, Suzuki H and Sugiyama Y (2003) Quantitative evaluation of the function of small intestinal P-glycoprotein: comparative studies between in situ and in vitro. *Pharm Res* **20**:1163-1169.
- Akabane T, Tabata K, Kadono K, Sakuda S, Terashita S and Teramura T (2010) A comparison of pharmacokinetics between humans and monkeys. *Drug Metab Dispos* **38**:308-316.
- Akanuma S, Uchida Y, Ohtsuki S, Tachikawa M, Terasaki T and Hosoya K (2011) Attenuation of prostaglandin E2 elimination across the mouse blood-brain barrier in lipopolysaccharide-induced inflammation and additive inhibitory effect of cefmetazole. *Fluids Barriers CNS* **8**:24.
- Amidon GL, Kou J, Elliott RL and Lightfoot EN (1980) Analysis of models for determining intestinal wall permeabilities. *J Pharm Sci* **69**:1369-1373.
- Amidon GL, Sinko PJ and Fleisher D (1988) Estimating human oral fraction dose absorbed: a correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds. *Pharm Res* **5**:651-654.
- Anderson BW, Levine AS, Levitt DG, Kneip JM and Levitt MD (1988) Physiological measurement of luminal stirring in perfused rat jejunum. *Am J Physiol* **254**:G843-848.
- Anderson CM, Howard A, Walters JR, Ganapathy V and Thwaites DT (2009) Taurine uptake across the human intestinal brush-border membrane is via two transporters: H⁺-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na⁺- and Cl⁻-dependent TauT (SLC6A6). *J*

Physiol **587**:731-744.

- Artursson P and Karlsson J (1991) Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* **175**:880-885.
- Ballatori N, Christian WV, Lee JY, Dawson PA, Soroka CJ, Boyer JL, Madejczyk MS and Li N (2005) OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology* **42**:1270-1279.
- Berggren S, Gall C, Wollnitz N, Ekelund M, Karlbom U, Hoogstraate J, Schrenk D and Lennernas H (2007) Gene and protein expression of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and CYP3A4 in the small and large human intestine. *Mol Pharm* **4**:252-257.
- Betts S, Bjorkhem-Bergman L, Rane A and Ekstrom L (2015) Expression of CYP3A4 and CYP3A7 in Human Foetal Tissues and its Correlation with Nuclear Receptors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **117**:261-266.
- Bleasby K, Castle JC, Roberts CJ, Cheng C, Bailey WJ, Sina JF, Kulkarni AV, Hafey MJ, Evers R, Johnson JM, Ulrich RG and Slatter JG (2006) Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: a resource for investigations into drug disposition. *Xenobiotica* **36**:963-988.
- Cao X, Gibbs ST, Fang L, Miller HA, Landowski CP, Shin HC, Lennernas H, Zhong Y, Amidon GL, Yu LX and Sun D (2006) Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. *Pharm Res* **23**:1675-1686.
- Carr B, Norcross R, Fang Y, Lu P, Rodrigues AD, Shou M, Rushmore T and Booth-Genthe C (2006) Characterization of the rhesus monkey CYP3A64 enzyme: species

- comparisons of CYP3A substrate specificity and kinetics using baculovirus-expressed recombinant enzymes. *Drug Metab Dispos* **34**:1703-1712.
- Chen X, Murawski A, Patel K, Crespi CL and Balimane PV (2008) A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. *Pharm Res* **25**:1511-1520.
- Court MH (2005) Isoform-selective probe substrates for in vitro studies of human UDP-glucuronosyltransferases. *Methods Enzymol* **400**:104-116.
- Court MH, Duan SX, von Moltke LL, Greenblatt DJ, Patten CJ, Miners JO and Mackenzie PI (2001) Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* **299**:998-1006.
- Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH and Dawson PA (1998) Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* **274**:G157-169.
- Curthoys NP and Shapiro R (1975) gamma-Glutamyltranspeptidase in intestinal brush border membranes. *FEBS Lett* **58**:230-233.
- Cvetkovic M, Leake B, Fromm MF, Wilkinson GR and Kim RB (1999) OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine. *Drug Metab Dispos* **27**:866-871.
- de Waart DR, van de Wetering K, Kunne C, Duijst S, Paulusma CC and Oude Elferink RP (2012) Oral availability of cefadroxil depends on ABCC3 and ABCC4. *Drug Metab Dispos* **40**:515-521.
- Delaunay JL, Breton M, Trugnan G and Maurice M (2008) Differential solubilization of inner plasma membrane leaflet components by Lubrol WX and Triton X-100. *Biochim Biophys Acta* **1778**:105-112.

- Delavenne X, Ollier E, Basset T, Bertolotti L, Accassat S, Garcin A, Laporte S, Zufferey P and Mismetti P (2012) A semi-mechanistic absorption model to evaluate drug-drug interaction with dabigatran: application with clarithromycin. *Br J Clin Pharmacol* **76**:107-113.
- Dickens F and Weil-Malherbe H (1941) Metabolism of normal and tumour tissue: The metabolism of intestinal mucous membrane. *Biochem J* **35**:7-15.
- Drozdzowski LA and Thomson AB (2006) Intestinal sugar transport. *World J Gastroenterol* **12**:1657-1670.
- Drozdik M, Groer C, Penski J, Lapczuk J, Ostrowski M, Lai Y, Prasad B, Unadkat JD, Siegmund W and Oswald S (2014) Protein abundance of clinically relevant multidrug transporters along the entire length of the human intestine. *Mol Pharm* **11**:3547-3555.
- Enokizono J, Kusuhara H and Sugiyama Y (2007) Regional expression and activity of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in mouse intestine: overlapping distribution with sulfotransferases. *Drug Metab Dispos* **35**:922-928.
- Estudante M, Morais JG, Soveral G and Benet LZ (2013) Intestinal drug transporters: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* **65**:1340-1356.
- Evans EM, Wrigglesworth JM, Burdett K and Pover WF (1971) Studies on epithelial cells isolated from guinea pig small intestine. *J Cell Biol* **51**:452-464.
- Finkbeiner SR, Hill DR, Altheim CH, Dedhia PH, Taylor MJ, Tsai YH, Chin AM, Mahe MM, Watson CL, Freeman JJ, Nattiv R, Thomson M, Klein OD, Shroyer NF, Helmrath MA, Teitelbaum DH, Dempsey PJ and Spence JR (2015) Transcriptome-wide Analysis Reveals Hallmarks of Human Intestine Development and Maturation In Vitro and In Vivo. *Stem Cell Reports*.
- Fisher JM, Wrighton SA, Watkins PB, Schmiedlin-Ren P, Calamia JC, Shen DD, Kunze

- KL and Thummel KE (1999) First-pass midazolam metabolism catalyzed by 1 α ,25-dihydroxy vitamin D₃-modified Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* **289**:1134-1142.
- Forbester JL, Goulding D, Vallier L, Hannan N, Hale C, Pickard D, Mukhopadhyay S and Dougan G (2015) Interaction of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium with Intestinal Organoids Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Infect Immun* **83**:2926-2934.
- Fuentes AV, Pineda MD and Venkata KCN (2018) Comprehension of Top 200 Prescribed Drugs in the US as a Resource for Pharmacy Teaching, Training and Practice. *Pharmacy (Basel)* **6**.
- Furukawa T, Nakamori F, Tetsuka K, Naritomi Y, Moriguchi H, Yamano K, Terashita S and Teramura T (2012) Quantitative prediction of intestinal glucuronidation of drugs in rats using in vitro metabolic clearance data. *Drug Metab Pharmacokinet* **27**:171-180.
- Furukawa T, Naritomi Y, Tetsuka K, Nakamori F, Moriguchi H, Yamano K, Terashita S, Tabata K and Teramura T (2014) Species differences in intestinal glucuronidation activities between humans, rats, dogs and monkeys. *Xenobiotica* **44**:205-216.
- Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczynski MJ and Zhang L (2010) Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* **9**:215-236.
- Gill RK, Saksena S, Alrefai WA, Sarwar Z, Goldstein JL, Carroll RE, Ramaswamy K and Dudeja PK (2005) Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**:C846-852.

- Glaeser H, Bailey DG, Dresser GK, Gregor JC, Schwarz UI, McGrath JS, Jolicoeur E, Lee W, Leake BF, Tirona RG and Kim RB (2007) Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. *Clin Pharmacol Ther* **81**:362-370.
- Groer C, Bruck S, Lai Y, Paulick A, Busemann A, Heidecke CD, Siegmund W and Oswald S (2013) LC-MS/MS-based quantification of clinically relevant intestinal uptake and efflux transporter proteins. *J Pharm Biomed Anal* **85**:253-261.
- Groer C, Busch D, Patrzyk M, Beyer K, Busemann A, Heidecke CD, Drozdik M, Siegmund W and Oswald S (2014) Absolute protein quantification of clinically relevant cytochrome P450 enzymes and UDP-glucuronosyltransferases by mass spectrometry-based targeted proteomics. *J Pharm Biomed Anal* **100**:393-401.
- Gstraunthaler G, Pfaller W and Kotanko P (1985) Biochemical characterization of renal epithelial cell cultures (LLC-PK1 and MDCK). *Am J Physiol* **248**:F536-544.
- Harbourt DE, Fallon JK, Ito S, Baba T, Ritter JK, Glish GL and Smith PC (2012) Quantification of human uridine-diphosphate glucuronosyl transferase 1A isoforms in liver, intestine, and kidney using nanobore liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **84**:98-105.
- Hartz AM, Bauer B, Fricker G and Miller DS (2006) Rapid modulation of P-glycoprotein-mediated transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *Mol Pharmacol* **69**:462-470.
- Harwood MD, Achour B, Russell MR, Carlson GL, Warhurst G and Rostami-Hodjegan A (2015) Application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of human intestinal transporter proteins absolute abundance using a QconCAT technique. *J Pharm Biomed Anal* **110**:27-33.
- Hashimoto K, Matsunaga N and Shimizu M (1994) Effect of vegetable extracts on the

- transepithelial permeability of the human intestinal Caco-2 cell monolayer. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **58**:1345-1346.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M and Brinkmann U (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:3473-3478.
- Hosokawa M (2008) Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs. *Molecules* **13**:412-431.
- Iizasa H, Genda N, Kitano T, Tomita M, Nishihara K, Hayashi M, Nakamura K, Kobayashi S and Nakashima E (2003) Altered expression and function of P-glycoprotein in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *J Pharm Sci* **92**:569-576.
- Imai T, Imoto M, Sakamoto H and Hashimoto M (2005) Identification of esterases expressed in Caco-2 cells and effects of their hydrolyzing activity in predicting human intestinal absorption. *Drug Metab Dispos* **33**:1185-1190.
- Ishiguro N, Kishimoto W, Volz A, Ludwig-Schwellinger E, Ebner T and Schaefer O (2014) Impact of endogenous esterase activity on in vitro p-glycoprotein profiling of dabigatran etexilate in Caco-2 monolayers. *Drug Metab Dispos* **42**:250-256.
- Ito K, Uchida Y, Ohtsuki S, Aizawa S, Kawakami H, Katsukura Y, Kamiie J and Terasaki T (2011) Quantitative membrane protein expression at the blood-brain barrier of adult and younger cynomolgus monkeys. *J Pharm Sci* **100**:3939-3950.
- Iwao T, Kodama N, Kondo Y, Kabeya T, Nakamura K, Horikawa T, Niwa T, Kurose K and Matsunaga T (2015) Generation of enterocyte-like cells with pharmacokinetic functions from human induced pluripotent stem cells using small-molecule

- compounds. *Drug Metab Dispos* **43**:603-610.
- Iwasaki K and Uno Y (2009) Cynomolgus monkey CYPs: a comparison with human CYPs. *Xenobiotica* **39**:578-581.
- Jones CR, Hatley OJ, Ungell AL, Hilgendorf C, Peters SA and Rostami-Hodjegan A (2016) Gut Wall Metabolism. Application of Pre-Clinical Models for the Prediction of Human Drug Absorption and First-Pass Elimination. *Aaps J* **18**:589-604.
- Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Elferink RP, Rosing H, Beijnen JH and Schinkel AH (2002) The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:15649-15654.
- Kabeya T, Matsumura W, Iwao T, Hosokawa M and Matsunaga T (2017) Functional analysis of carboxylesterase in human induced pluripotent stem cell-derived enterocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **486**:143-148.
- Kadono K, Akabane T, Tabata K, Gato K, Terashita S and Teramura T (2010) Quantitative prediction of intestinal metabolism in humans from a simplified intestinal availability model and empirical scaling factor. *Drug Metab Dispos* **38**:1230-1237.
- Kamiie J, Ohtsuki S, Iwase R, Ohmine K, Katsukura Y, Yanai K, Sekine Y, Uchida Y, Ito S and Terasaki T (2008) Quantitative atlas of membrane transporter proteins: development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. *Pharm Res* **25**:1469-1483.
- Kararli TT (1995) Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos* **16**:351-380.

- Karibe T, Hagihara-Nakagomi R, Abe K, Imaoka T, Mikkaichi T, Yasuda S, Hirouchi M, Watanabe N, Okudaira N and Izumi T (2015) Evaluation of the usefulness of breast cancer resistance protein (BCRP) knockout mice and BCRP inhibitor-treated monkeys to estimate the clinical impact of BCRP modulation on the pharmacokinetics of BCRP substrates. *Pharm Res* **32**:1634-1647.
- Kauffman AL, Gyurdieva AV, Mabus JR, Ferguson C, Yan Z and Hornby PJ (2013) Alternative functional in vitro models of human intestinal epithelia. *Front Pharmacol* **4**:79.
- Kawai K, Fujita M and Nakao M (1974) Lipid components of two different regions of an intestinal epithelial cell membrane of mouse. *Biochim Biophys Acta* **369**:222-233.
- Keskitalo JE, Zolk O, Fromm MF, Kurkinen KJ, Neuvonen PJ and Niemi M (2009) ABCG2 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther* **86**:197-203.
- Kim HR, Park SW, Cho HJ, Chae KA, Sung JM, Kim JS, Landowski CP, Sun D, Abd El-Aty AM, Amidon GL and Shin HC (2007) Comparative gene expression profiles of intestinal transporters in mice, rats and humans. *Pharmacol Res* **56**:224-236.
- Kitamura Y, Hirouchi M, Kusuhara H, Schuetz JD and Sugiyama Y (2008) Increasing systemic exposure of methotrexate by active efflux mediated by multidrug resistance-associated protein 3 (mrp3/abcc3). *J Pharmacol Exp Ther* **327**:465-473.
- Kodaira H, Kusuhara H, Fujita T, Ushiki J, Fuse E and Sugiyama Y (2011) Quantitative evaluation of the impact of active efflux by p-glycoprotein and breast cancer resistance protein at the blood-brain barrier on the predictability of the unbound concentrations of drugs in the brain using cerebrospinal fluid concentration as a surrogate. *J Pharmacol Exp Ther* **339**:935-944.
- Kodama N, Iwao T, Katano T, Ohta K, Yuasa H and Matsunaga T (2016) Characteristic

- Analysis of Intestinal Transport in Enterocyte-Like Cells Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Drug Metab Dispos* **44**:0.
- Korjamo T, Heikkinen AT and Monkkonen J (2009) Analysis of unstirred water layer in in vitro permeability experiments. *J Pharm Sci* **98**:4469-4479.
- Kusuhara H, Furuie H, Inano A, Sunagawa A, Yamada S, Wu C, Fukizawa S, Morimoto N, Ieiri I, Morishita M, Sumita K, Mayahara H, Fujita T, Maeda K and Sugiyama Y (2012) Pharmacokinetic interaction study of sulphasalazine in healthy subjects and the impact of curcumin as an in vivo inhibitor of BCRP. *Br J Pharmacol* **166**:1793-1803.
- Laftah AH, Latunde-Dada GO, Fakih S, Hider RC, Simpson RJ and McKie AT (2009) Haem and folate transport by proton-coupled folate transporter/haem carrier protein 1 (SLC46A1). *Br J Nutr* **101**:1150-1156.
- Lennernas H (1998) Human intestinal permeability. *J Pharm Sci* **87**:403-410.
- Levitt MD, Furne JK, Stocchi A, Anderson BW and Levitt DG (1990) Physiological measurements of luminal stirring in the dog and human small bowel. *J Clin Invest* **86**:1540-1547.
- Li W, Escarpe PA, Eisenberg EJ, Cundy KC, Sweet C, Jakeman KJ, Merson J, Lew W, Williams M, Zhang L, Kim CU, Bischofberger N, Chen MS and Mendel DB (1998) Identification of GS 4104 as an orally bioavailable prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:647-653.
- Lloret-Linares C, Miyauchi E, Luo H, Labat L, Bouillot JL, Poitou C, Oppert JM, Laplanche JL, Mouly S, Scherrmann JM, Uchida Y, Tachikawa M, Terasaki T, Bergmann JF and Decleves X (2013) Oral Morphine Pharmacokinetic in Obesity: The Role of P-Glycoprotein, MRP2, MRP3, UGT2B7, and CYP3A4 Jejunal

- Contents and Obesity-Associated Biomarkers. *Mol Pharm* **13**:766-773.
- Mayhew TM and Middleton C (1985) Crypts, villi and microvilli in the small intestine of the rat. A stereological study of their variability within and between animals. *J Anat* **141**:1-17.
- Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Blumberg B and Sasano H (2005) Steroid and xenobiotic receptor (SXR), cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance gene 1 in human adult and fetal tissues. *Mol Cell Endocrinol* **231**:75-85.
- Miyauchi E, Tachikawa M, Decleves X, Uchida Y, Bouillot JL, Poitou C, Oppert JM, Mouly S, Bergmann JF, Terasaki T, Scherrmann JM and Lloret-Linares C (2016) Quantitative Atlas of Cytochrome P450, UDP-Glucuronosyltransferase, and Transporter Proteins in Jejunum of Morbidly Obese Subjects. *Mol Pharm* **13**:2631-2640.
- Morita SY, Ikeda N, Horikami M, Soda K, Ishihara K, Teraoka R, Terada T and Kitagawa S (2011) Effects of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase on phospholipid composition, microvillus formation and bile salt resistance in LLC-PK1 cells. *Febs J* **278**:4768-4781.
- Nakamura K, Hirayama-Kurogi M, Ito S, Kuno T, Yoneyama T, Obuchi W, Terasaki T and Ohtsuki S (2016) Large-scale multiplex absolute protein quantification of drug-metabolizing enzymes and transporters in human intestine, liver, and kidney microsomes by SWATH-MS: Comparison with MRM/SRM and HR-MRM/PRM. *Proteomics* **16**:2106-2117.
- Nakanishi Y, Matsushita A, Matsuno K, Iwasaki K, Utoh M, Nakamura C and Uno Y (2011) Regional distribution of drug-metabolizing enzyme activities in the liver and small intestine of cynomolgus monkeys. *Drug Metab Pharmacokinet* **26**:288-294.

- Nawa A, Fujita Hamabe W and Tokuyama S (2010) Inducible nitric oxide synthase-mediated decrease of intestinal P-glycoprotein expression under streptozotocin-induced diabetic conditions. *Life Sci* **86**:402-409.
- Nishimura M, Koeda A, Morikawa H, Satoh T, Narimatsu S and Naito S (2009) Tissue-specific mRNA expression profiles of drug-metabolizing enzymes and transporters in the cynomolgus monkey. *Drug Metab Pharmacokinet* **24**:139-144.
- Nishimura M and Naito S (2005) Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* **20**:452-477.
- Nishimura M and Naito S (2006) Tissue-specific mRNA expression profiles of human phase I metabolizing enzymes except for cytochrome P450 and phase II metabolizing enzymes. *Drug Metab Pharmacokinet* **21**:357-374.
- Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S and Satoh T (2003) Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* **123**:369-375.
- Nishimura T, Amano N, Kubo Y, Ono M, Kato Y, Fujita H, Kimura Y and Tsuji A (2007) Asymmetric intestinal first-pass metabolism causes minimal oral bioavailability of midazolam in cynomolgus monkey. *Drug Metab Dispos* **35**:1275-1284.
- Nishimura T, Kato Y, Amano N, Ono M, Kubo Y, Kimura Y, Fujita H and Tsuji A (2008) Species difference in intestinal absorption mechanism of etoposide and digoxin between cynomolgus monkey and rat. *Pharm Res* **25**:2467-2476.
- Nishimura H, Sato K, Mizuki Y, Yabuki M and Komuro S (2010) Prediction of the intestinal first-pass metabolism of CYP3A substrates in humans using cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos* **38**:1967-1975.
- Obach RS, Zhang QY, Dunbar D and Kaminsky LS (2001) Metabolic characterization of

- the major human small intestinal cytochrome p450s. *Drug Metab Dispos* **29**:347-352.
- Ogaki S, Morooka M, Otera K and Kume S (2015) A cost-effective system for differentiation of intestinal epithelium from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* **5**:17297.
- Ogaki S, Shiraki N, Kume K and Kume S (2013) Wnt and Notch signals guide embryonic stem cell differentiation into the intestinal lineages. *Stem Cells* **31**:1086-1096.
- Ogasawara A, Kume T and Kazama E (2007) Effect of oral ketoconazole on intestinal first-pass effect of midazolam and fexofenadine in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos* **35**:410-418.
- Ogihara H, Saito H, Shin BC, Terado T, Takenoshita S, Nagamachi Y, Inui K and Takata K (1996) Immuno-localization of H⁺/peptide cotransporter in rat digestive tract. *Biochem Biophys Res Commun* **220**:848-852.
- Ogihara T, Kano T, Wagatsuma T, Wada S, Yabuuchi H, Enomoto S, Morimoto K, Shirasaka Y, Kobayashi S and Tamai I (2009) Oseltamivir (tamiflu) is a substrate of peptide transporter 1. *Drug Metab Dispos* **37**:1676-1681.
- Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Saito A, Ishiguro N, Kishimoto W, Ludwig-Schwellinger E, Ebner T and Terasaki T (2012) Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metab Dispos* **40**:83-92.
- Ozawa T, Takayama K, Okamoto R, Negoro R, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K and Mizuguchi H (2015) Generation of enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells for drug absorption and metabolism studies in human small

intestine. *Sci Rep* **5**:16479.

Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE and Zeldin DC (2006) The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos* **34**:880-886.

Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, Perkins JD and Thummel KE (1997) Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* **283**:1552-1562.

Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD, Marsh CL, McVicar JP, Barr DM, Gillies BS and Thummel KE (1996) First-pass metabolism of midazolam by the human intestine. *Clin Pharmacol Ther* **60**:14-24.

Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR and Schacht AL (2010) How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov* **9**:203-214.

Poirier A, Portmann R, Cascais AC, Bader U, Walter I, Ullah M and Funk C (2014) The need for human breast cancer resistance protein substrate and inhibition evaluation in drug discovery and development: why, when, and how? *Drug Metab Dispos* **42**:1466-1477.

Prueksaritanont T, Gorham LM, Hochman JH, Tran LO and Vyas KP (1996) Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines, and in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos* **24**:634-642.

Rashid TJ, Martin U, Clarke H, Waller DG, Renwick AG and George CF (1995) Factors affecting the absolute bioavailability of nifedipine. *Br J Clin Pharmacol* **40**:51-58.

Ritter JK (2007) Intestinal UGTs as potential modifiers of pharmacokinetics and biological responses to drugs and xenobiotics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*

3:93-107.

- Roder PV, Geillinger KE, Zietek TS, Thorens B, Koepsell H and Daniel H (2014) The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PLoS One* **9**:e89977.
- Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F and Kuhn LC (1999) LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* **274**:34948-34954.
- Rubio-Aliaga I and Daniel H (2008) Peptide transporters and their roles in physiological processes and drug disposition. *Xenobiotica* **38**:1022-1042.
- Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD and Clevers H (2011) Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* **141**:1762-1772.
- Seward DJ, Koh AS, Boyer JL and Ballatori N (2003) Functional complementation between a novel mammalian polygenic transport complex and an evolutionarily ancient organic solute transporter, OSTalpha-OSTbeta. *J Biol Chem* **278**:27473-27482.
- Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ and McKie AT (2005) Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* **122**:789-801.
- Shin HC, Kim HR, Cho HJ, Yi H, Cho SM, Lee DG, Abd El-Aty AM, Kim JS, Sun D and Amidon GL (2009) Comparative gene expression of intestinal metabolizing enzymes. *Biopharm Drug Dispos* **30**:411-421.
- Shirasaka Y, Sakane T and Yamashita S (2008) Effect of P-glycoprotein expression levels

- on the concentration-dependent permeability of drugs to the cell membrane. *J Pharm Sci* **97**:553-565.
- Simpson K and Jarvis B (2000) Fexofenadine: a review of its use in the management of seasonal allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria. *Drugs* **59**:301-321.
- Sjoberg A, Lutz M, Tannergren C, Wingolf C, Borde A and Ungell AL (2013) Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique. *Eur J Pharm Sci* **48**:166-180.
- Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, Hoskins EE, Kalinichenko VV, Wells SI, Zorn AM, Shroyer NF and Wells JM (2011) Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* **470**:105-109.
- Stephens RH, Tanianis-Hughes J, Higgs NB, Humphrey M and Warhurst G (2002) Region-dependent modulation of intestinal permeability by drug efflux transporters: in vitro studies in *mdr1a*(-/-) mouse intestine. *J Pharmacol Exp Ther* **303**:1095-1101.
- Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey RH and Manns MP (2000) Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem* **275**:36164-36171.
- Sugano K, Takata N, Machida M, Saitoh K and Terada K (2002) Prediction of passive intestinal absorption using bio-mimetic artificial membrane permeation assay and the paracellular pathway model. *Int J Pharm* **241**:241-251.
- Sy SK, Ciaccia A, Li W, Roberts EA, Okey A, Kalow W and Tang BK (2002) Modeling of human hepatic CYP3A4 enzyme kinetics, protein, and mRNA indicates

- deviation from log-normal distribution in CYP3A4 gene expression. *Eur J Clin Pharmacol* **58**:357-365.
- Taipalensuu J, Tornblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjoqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjoström B, Lundgren B and Artursson P (2001) Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* **299**:164-170.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K and Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**:861-872.
- Takahashi M, Washio T, Suzuki N, Igeta K and Yamashita S (2009) The species differences of intestinal drug absorption and first-pass metabolism between cynomolgus monkeys and humans. *J Pharm Sci* **98**:4343-4353.
- Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H and Eto K (2010) Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med* **207**:2817-2830.
- Takenaka T, Harada N, Kuze J, Chiba M, Iwao T and Matsunaga T (2014) Human small intestinal epithelial cells differentiated from adult intestinal stem cells as a novel system for predicting oral drug absorption in humans. *Drug Metab Dispos* **42**:1947-1954.
- Tamai I (2012) Oral drug delivery utilizing intestinal OATP transporters. *Adv Drug Deliv Rev* **64**:508-514.
- Tamai I, Sai Y, Ono A, Kido Y, Yabuuchi H, Takanaga H, Satoh E, Ogihara T, Amano O,

- Izeki S and Tsuji A (1999) Immunohistochemical and functional characterization of pH-dependent intestinal absorption of weak organic acids by the monocarboxylic acid transporter MCT1. *J Pharm Pharmacol* **51**:1113-1121.
- Tapaninen T, Backman JT, Kurkinen KJ, Neuvonen PJ and Niemi M (2011) Itraconazole, a P-glycoprotein and CYP3A4 inhibitor, markedly raises the plasma concentrations and enhances the renin-inhibiting effect of aliskiren. *J Clin Pharmacol* **51**:359-367.
- Uchida H, Machida M, Miura T, Kawasaki T, Okazaki T, Sasaki K, Sakamoto S, Ohuchi N, Kasahara M, Umezawa A and Akutsu H (2017) A xenogeneic-free system generating functional human gut organoids from pluripotent stem cells. *JCI Insight* **2**:e86492.
- Uchida Y, Ohtsuki S, Kamiie J and Terasaki T (2011a) Blood-brain barrier (BBB) pharmacoproteomics: reconstruction of in vivo brain distribution of 11 P-glycoprotein substrates based on the BBB transporter protein concentration, in vitro intrinsic transport activity, and unbound fraction in plasma and brain in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **339**:579-588.
- Uchida Y, Ohtsuki S, Katsukura Y, Ikeda C, Suzuki T, Kamiie J and Terasaki T (2011b) Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem* **117**:333-345.
- Uchida Y, Ohtsuki S and Terasaki T (2014a) Pharmacoproteomics-based reconstruction of in vivo P-glycoprotein function at blood-brain barrier and brain distribution of substrate verapamil in pentylenetetrazole-kindled epilepsy, spontaneous epilepsy, and phenytoin treatment models. *Drug Metab Dispos* **42**:1719-1726.
- Uchida Y, Tachikawa M, Obuchi W, Hoshi Y, Tomioka Y, Ohtsuki S and Terasaki T (2013) A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-

- MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. *Fluids Barriers CNS* **10**:21.
- Uchida Y, Wakayama K, Ohtsuki S, Chiba M, Ohe T, Ishii Y and Terasaki T (2014b) Blood-brain barrier pharmacoproteomics-based reconstruction of the in vivo brain distribution of P-glycoprotein substrates in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **350**:578-588.
- Uchida Y, Zhang Z, Tachikawa M and Terasaki T (2015) Quantitative targeted absolute proteomics of rat blood-cerebrospinal fluid barrier transporters: comparison with a human specimen. *J Neurochem* **134**:1104-1115.
- van Heek M, Farley C, Compton DS, Hoos L, Alton KB, Sybertz EJ and Davis HR, Jr. (2000) Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663. *Br J Pharmacol* **129**:1748-1754.
- van Waterschoot RA, ter Heine R, Wagenaar E, van der Kruijssen CM, Rooswinkel RW, Huitema AD, Beijnen JH and Schinkel AH (2010) Effects of cytochrome P450 3A (CYP3A) and the drug transporters P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) and MRP2 (ABCC2) on the pharmacokinetics of lopinavir. *Br J Pharmacol* **160**:1224-1233.
- Varma MV, Obach RS, Rotter C, Miller HR, Chang G, Steyn SJ, El-Kattan A and Troutman MD (2010) Physicochemical space for optimum oral bioavailability: contribution of human intestinal absorption and first-pass elimination. *J Med Chem* **53**:1098-1108.
- Wegler C, Gaugaz FZ, Andersson TB, Wisniewski JR, Busch D, Groer C, Oswald S, Noren A, Weiss F, Hammer HS, Joos TO, Poetz O, Achour B, Rostami-Hodjegan A, van de Steeg E, Wortelboer HM and Artursson P (2017) Variability in Mass

- Spectrometry-based Quantification of Clinically Relevant Drug Transporters and Drug Metabolizing Enzymes. *Mol Pharm* **14**:3142-3151.
- Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, Sakane T, Sezaki H and Tokuda H (2000) Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* **10**:195-204.
- Yoda N, Emoto C, Date S, Kondo S, Miyake M, Nakazato S, Umehara K and Kashiwayama E (2012) Characterization of intestinal and hepatic P450 enzymes in cynomolgus monkeys with typical substrates and inhibitors for human P450 enzymes. *Xenobiotica* **42**:719-730.
- Yuasa H, Matsuda K and Watanabe J (1993) Influence of anesthetic regimens on intestinal absorption in rats. *Pharm Res* **10**:884-888.
- Zaher H, Khan AA, Palandra J, Brayman TG, Yu L and Ware JA (2006) Breast cancer resistance protein (Bcrp/abcg2) is a major determinant of sulfasalazine absorption and elimination in the mouse. *Mol Pharm* **3**:55-61.
- Zhang QY, Dunbar D, Ostrowska A, Zeisloft S, Yang J and Kaminsky LS (1999) Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* **27**:804-809.
- Zhang Y and Benet LZ (2001) The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet* **40**:159-168.
- Zhao YH, Le J, Abraham MH, Hersey A, Eddershaw PJ, Luscombe CN, Butina D, Beck G, Sherborne B, Cooper I and Platts JA (2001) Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure-activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors. *J Pharm Sci* **90**:749-784.
- Zhou SF, Wang LL, Di YM, Xue CC, Duan W, Li CG and Li Y (2008) Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications

in drug development. *Curr Med Chem* **15**:1981-2039.

謝辞

本研究に際して終始御指導，御鞭撻を賜りました東北大学大学院 薬学研究科 薬物送達学分野 教授 寺崎 哲也 先生に謹んで感謝致します。

本論文の審査にあたり，有益な御助言を賜りました東北大学大学院 薬学研究科 がん化学療法薬学分野 教授 富岡 佳久 先生，同 生活習慣病治療薬学分野 教授 平澤 典保 先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり，有益な御指導と御助言を賜りました熊本大学大学院 生命科学研究部 微生物薬学分野 教授 大槻 純男 先生 (旧：本学大学院 薬学研究科 薬物送達学分野 准教授)，徳島大学大学院 医歯薬学研究部 創薬理論化学分野 教授 立川 正憲 先生 (旧：東北大学大学院 薬学研究科 薬物送達学分野 准教授) に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり，懇切丁寧な御指導と御助言を頂きました東北大学大学院 薬学研究科 薬物送達学分野 講師 内田 康雄 先生，富山大学大学院 医学薬学研究部 薬剤学研究室 准教授 久保 義行先生 (旧：東北大学大学院 薬学研究科 薬物送達学分野 助教) に心より感謝致します。

本研究の遂行に際して，数多くの御指導と御助言を頂きました塩野義製薬株式会社 創薬疾患研究所 高橋 浩治 氏，同 開発研究所 金津 卓史 氏，大西 秀一 氏，吉田 晋平 氏，同 創薬化学研究所 河井 真 氏に心より感謝致します。

本研究で使用した L-mdr1a 細胞を快く恵与して頂きました the Netherlands Cancer Institute Alfred H. Schinkel 博士，ならびに，ヒト iPS 細胞 (TkDA3-4 株) を

快く恵与して頂きました東京大学 医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞プロセッシング分野 ステムセルバンク 大津 真 先生に謹んで感謝致します.

本研究全般にわたり, 多大なる御協力と御配慮を頂きました東北大学大学院 薬学研究科 薬物送達学分野の皆様, 塩野義製薬株式会社 開発研究所 薬物動態研究部門, 同 創薬疾患研究所 基盤技術部門, シオノギテクノアドバンスリサーチ株式会社の皆様に厚く御礼申し上げます.

最後に, 多大なる援助と激励を下さりました家族に心より感謝致します.

2019 年 3 月

赤澤 貴憲